

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**“Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos
de *Luma chequen* (molina) a. gray “arrayán” frente a
patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional**

**Guillermo Almenara Irigoyen,
Lima - Perú.”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

AUTOR

Torres Chati, Jani

Lima – Perú

2014

Dedico esta tesis a mis queridos padres Teódula y Crisóstomo, los que siempre me apoyaron incondicionalmente y estuvieron en los momentos difíciles de este largo camino, que siempre me alentaron para seguir adelante y concretar mi objetivo.

A mis hermanos Ivan y José que a pesar de las dificultades me enseñaron a seguir adelante.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme estar aquí disfrutando de lo más hermoso que es la vida, por estar siempre a mi lado y mostrarme que en El siempre habrá esperanza y que todo se puede lograr mientras exista amor y paz.

A mis queridos padres, Teódula y Crisóstomo, por ser mi fortaleza gracias a su inmenso amor, paciencia y comprensión, por enseñarme que en esta vida hay que ser fuertes y luchar a pesar de las adversidades y que siempre hay una esperanza. Mil gracias por todo lo que brindan día a día.

A mis hermanos Ivan y José, por su apoyo y todas sus críticas constructivas, que aunque a veces drásticas y duras, se que tienen el objetivo de ayudarme a crecer personal y profesionalmente.

A mis estimados profesores Mónica Huamán, Domingo Iparraguirre y Susana Gutiérrez, de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM, por su ejemplo y consejos durante mis estudios académicos y especialmente en estas últimas semanas, como parte de sus importantes observaciones para que la presente tesis mantenga un alto nivel académico.

A mi Asesor Mg Jorge León Quispe y co-asesora de Tesis Gloria Eva Tomas Chota, no solo por la confianza brindada durante este tiempo, sino también por su orientación en la realización de esta Tesis, por el tiempo dedicado, así como por su constante estímulo, sin los cuales este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

Además quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que en alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

1.	INTRODUCCION	1
2.	MARCO TEORICO	5
2.1	Las plantas como fuente de compuestos medicinales	5
2.2	Fitoterapia	8
2.3	Extracción	9
2.4	Extractos Vegetales	11
2.5	Pruebas fitoquímicas cualitativas preliminares	12
2.6	Metabolitos	13
2.6.1	Metabolitos Primarios	14
2.6.2	Metabolitos Secundarios	14
2.7	Familia Myrtaceae	21
2.8	Descripción de la especie vegetal	25
2.9	Infecciones nosocomiales	30
2.10	Hemocultivo	31
2.11	Bacteriemia	31
2.12	Candidemia	33
2.13	Principales patógenos aislados de hemocultivos	34

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	40
3.1 Hipótesis	40
3.2 Objetivos	40
3.2.1 Objetivo General	40
3.2.2 Objetivos Específicos	40
4. MATERIALES Y METODOS	41
4.1 Materiales	41
4.1.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio	41
4.1.2 Microorganismos	41
4.2 Metodología	43
4. 2.1. Preparación del pulverizado vegetal	43
4.2.2. Obtención del extracto	43
4.2.2.1. Extracción con hexano	43
4.2.2.2. Extracción con diclorometano	44
4.2.2.4 Extracción con etanol	44
4.2.2.4 Extracción acuosa	44
4.2.3 Tamizaje fitoquímico	45
4.2.4 Obtención, reactivación y verificación de las cepas clínicas	49
4.2.5 Preparación y estandarización del inóculo	50
4.2.6 Determinación de la sensibilidad de cepas patógenas a los extractos de hexano, diclorometano, etanol y agua de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray “Arrayán” mediante el Método Modificado de Difusión en Pocillos (MDP)	51
4.2.7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	54
4.2.8 Análisis e interpretación de resultados	56

5. RESULTADOS	57
5.1 Obtención de extractos	57
5.2 Tamizaje fitoquímico preliminar	57
5.3 Obtención, reactivación y verificación de las cepas hospitalarias	59
5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana	61
5.4.1 Análisis de datos para cepas patógenas bacterianas	66
5.4.2 Análisis de datos para levaduras patógenas del género <i>Cándida</i>	72
5.5 Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico	77
6. DISCUSIÓN	80
7. CONCLUSIONES	90
8. RECOMENDACIONES	91
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
10. ANEXOS	108

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC: American Type Culture Collection
- CECT: Colección Española De Cultivos Tipo
- MDP: Método Modificado de Difusión en Pocillos
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- INS: Instituto Nacional de Salud
- WHO: Organización Mundial de la Salud (Del inglés: "World Health Organization")
- CLSI: Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (Del inglés: Clinical and Laboratory Standards Institute)
- ANOVA: análisis de Varianza
- mL: Mililitro
- μ L: Microlitro
- mg : Miligramos
- IN: Infecciones Nosocomiales
- UCI: Unidad De Cuidados Intensivos
- TSA: Agar Soya Tripticasa (Del inglés: "Trypticase Soja Agar")
- TSB: Caldo Soya Tripticasa (Del inglés: "Trypticase Soja Broth")
- ASD : Agar Sabouraud Dextrosa
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- TTC: 2,3,5-Trifenil Tetrazolio cloruro

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos utilizados en el estudio de la actividad antimicrobiana de <i>Luma chequen</i> .	42
Tabla 2. Descripción de extractos orgánicos de <i>Luma chequen</i> .	57
Tabla 3. Pruebas fitoquímicas de identificación de metabolitos secundarios encontrados en el extracto acuoso de “arrayán”.	58
Tabla 4. Identificación y caracterización de Enterobacterias.	59
Tabla 5. Identificación y caracterización del género <i>Staphylococcus</i> .	60
Tabla 6. Identificación y caracterización de levaduras del género <i>Cándida</i> .	60
Tabla 7. Normas de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión M100-S23 (CLSI, 2013).	61
Tabla 8. Método de referencia para las pruebas de Sensibilidad Antifúngica de levaduras por el Método de Disco Difusión M44-A (CLSI, 2004).	62
Tabla 9. Susceptibilidad de los microorganismos de origen hospitalario frente a un antibiótico de referencia.	62
Tabla 10. Susceptibilidad de los microorganismos de origen referencial frente a un antibiótico de referencia.	63
Tabla 11. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos orgánicos de <i>Luma chequen</i> frente a bacterias patógenas.	63
Tabla 12. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos orgánicos de <i>Luma chequen</i> frente a las levaduras.	64
Tabla 13. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para patógenos bacterianos.	67

Tabla 14. Subconjuntos homogéneos - DHS de Tukey generales (solventes de extracción frente a bacterias patógenas).	68
Tabla 15. Intervalos generales de confianza al 95% (Solvente de extracción usado frente a bacterias patógenas).	69
Tabla 16. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para levaduras patógenas del género <i>Cándida</i> .	72
Tabla 17. Subconjuntos homogéneos - DHS de Tukey generales (solventes de extracción utilizados frente a patógenos del género <i>Cándida</i>).	73
Tabla 18. Intervalos generales de confianza al 95% (Solvente de extracción frente a patógenos del género <i>Cándida</i>).	74
Tabla 19. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de <i>Luma chequen</i> “arrayán” frente a cepas patógenas bacterianas.	78
Tabla 20. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de <i>Luma chequen</i> “arrayán” frente a patógenas del género <i>Cándida</i> .	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Planta de <i>Luma chequen</i> “arrayán”.	26
Figura 2.- Detalles de la floración y flor de <i>Luma chequen</i> .	27
Figura 3: Comprobación visual de la escala 0.5 de Mc Farland.	51
Figura 4. Medición de diámetros de halos de inhibición de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos.	53
Figura 5. Actividad antimicrobiana del extracto hexánico.	64
Figura 6. Actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico.	65
Figura 7. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico.	65
Figura 8. Actividad antimicrobiana del extracto acuoso.	66
Figura 9. Media del diámetro del halo de inhibición, según el tipo de extracto y el control positivo frente a bacterias patógenas.	70
Figura 10. Media del diámetro del halo de inhibición del extracto etanólico comparado con el control positivo frente a bacterias patógenas.	70
Figura 11. Actividad de bacterias patógenas frente al tipo de extracto y el control positivo.	71
Figura 12. Media del diámetro del halo de inhibición, según el tipo de extracto y el control positivo frente a patógenos del género <i>Cándida</i> .	75
Figura 13. Media del diámetro del halo de inhibición del extracto etanólico comparado con el control positivo frente a patógenos del género <i>Cándida</i> .	75
Figura 14. Actividad de patógenos del género <i>Cándida</i> frente al tipo de extracto y el control positivo.	76
Figura15. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de <i>Luma Chequen</i> frente a cepas patógenas bacterianas.	78
Figura16. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de <i>Luma chequen</i> frente a patógenas del género <i>Cándida</i> .	79

Resumen

Ante el incremento alarmante de la resistencia antimicrobiana, en la actualidad a nivel mundial se viene explorando y valorando el uso de productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicrobianos. El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos de *Luma chequen* “arrayán” frente a patógenos bacterianos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) y fúngicos (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*) aislados de hemocultivos y cepas controles ATCC (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* 750). La obtención de los extractos se realizó utilizando solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, etanol) y el agua. La evaluación de la actividad de los extractos se realizó mediante el método modificado de difusión en “pocillos”, determinándose que el extracto etanólico presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a los patógenos evaluados. En cuanto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico, los resultados más notorios fueron frente *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Klebsiella pneumoniae* con una CMI de 3,125 mg/mL y contra *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* que presentaron una CMI de 1,56 mg/mL. El tamizaje fitoquímico de *Luma chequen* determinó la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, triterpenos y/o esteroides, alcaloides y leucoantocianidinas. Se concluye que *Luma chequen* “arrayán” presenta amplio espectro de acción antimicrobiana.

Palabras claves: *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”, extractos orgánicos, actividad antimicrobiana, plantas medicinales.

Abstract

Facing the increase antimicrobial resistance, currently at the global level has been exploring and evaluating the use of natural products as a source of new and varied antimicrobial agents. The main objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of organic extracts from *Luma chequen* "myrtle" against bacterial pathogens (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) and fungal (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*) isolated from blood cultures and controls ATCC strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* 750). The extracts were obtained using solvents of different polarity (hexane, dichloromethane, ethanol) and water. The evaluation of activity of the extracts was performed by the modified diffusion method "wells", demonstrating that ethanol extract had the greatest antimicrobial activity against the pathogens tested. Regarding the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the ethanolic extract, the most highlighting results were against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Klebsiella pneumoniae* with MIC of 3.125 mg / mL and against *Candida tropicalis* and of 1, 56 mg / mL for *Candida parapsilosis*. The phytochemical screening of *Luma chequen* determined the presence of phenolic compounds, tannins, flavonoids, triterpenes and / or steroids, alkaloids and leucoanthocyanidins.

Keywords: *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán", extracts, antimicrobial activity, medicinal plants, herbal medicine.

1. INTRODUCCIÓN

El uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos en el control y prevención de enfermedades ha provocado la aparición de nuevas formas clínicas, así como localizaciones no habituales y diseminación de nuevos mecanismos de resistencia antimicrobiana, lo que justifica los diferentes cambios en el perfil de sensibilidad y resistencia presentados por los agentes etiológicos de infecciones nosocomiales.

Esto conlleva a un problema que va cada vez en aumento y que plantea una grave amenaza a la salud pública (Morales *et al.*, 2012), involucrando nuevas especies bacterianas y fúngicas consideradas antiguamente como no patógenas pero que excepcionalmente producían enfermedad en individuos inmunodeprimidos (Paz *et al.*, 2008; Pfaller *et al.*, 2007; Nuri *et al.*, 2011).

La resistencia a los antimicrobianos tiene su costo en dinero, medios de subsistencia y vidas humanas, pone en peligro la eficacia de los programas de atención de la salud y podría llegar a constituir una amenaza para la estabilidad mundial y la seguridad de los países (WHO, 2001).

Las infecciones nosocomiales (IN) son frecuentes principalmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), donde presentan hasta en un 20% de pacientes internados (Paz *et al.*, 2008). De estos casos las más frecuentes son las infecciones del torrente sanguíneo (bacteriemia) con un total de 60,5% (Becerra *et al.*, 2010).

La bacteriemia nosocomial es una causa importante de infección intrahospitalaria, asociada con una alta morbi-mortalidad permaneciendo con un índice que varía según distintos estudios entre 17,5 a 40% (Reimer *et al.*, 1997; Pazos *et al.*, 2001; Nazar *et al.*, 2010).

Flores y colaboradores en el 2011 en un reporte de datos sobre la susceptibilidad antimicrobiana en el servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara entre los años 2009 y 2010, señalan que la frecuencia de aislamiento de *Candida*, correspondieron al 20% de las infecciones del torrente sanguíneo en UCI, siendo la primera infección más frecuente en esta localización y de las cuales presentan una predominancia de las *Candida* no albicans (59%), seguido de *Estafilococo* coagulasa negativo 18 %, *Escherichia coli* 9%, *Staphylococcus aureus* 9% y *Klebsiella pneumoniae* 7%.

Candida albicans es considerada como una causa importante de candidemias sistémicas, sin embargo en los últimos años el 61% de casos que se presentan en las UCI se deben a otras especies “no albicans”, lo que conlleva a pensar que existe un aumento significativo de nuevas especies patógenas (Paz *et al.*, 2008).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) hizo un llamado a los países para que incrementen sus esfuerzos en controlar la resistencia antimicrobiana; promover las políticas nacionales de desarrollo sustentable y el uso racional de antimicrobianos; desarrollar sistemas de comunicación para recabar y compartir datos sobre resistencia de patógenos específicos, además de promover la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (WHO, 2002).

En la actualidad, las posibilidades terapéuticas se ven notablemente menguadas por la ausencia de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos patógenos; y a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de estas infecciones, se presenta problemas de resistencia, espectro de acción, costo y efectos adversos en el paciente como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y fototoxicidad (Pfaller *et al.*, 2007; Nazar *et al.*, 2010; Pemán *et al.*, 2011). Debido a estas razones se debe orientar los esfuerzos a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones.

Los productos naturales derivados de plantas como aceites esenciales y sus extractos orgánicos podrían proporcionar metabolitos bioactivos como una alternativa de tratamiento o prevención a las infecciones intrahospitalarias, ya que muchas de estas plantas son conocidas empíricamente por sus propiedades médico-farmacológicas (Alzamora *et al.*, 2001; Huamani & Ruiz, 2005; Ávila *et al.*, 2006; Añanca, 2009; Rodríguez *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2011).

Aproximadamente del 25 al 50% de los fármacos actuales son derivados de plantas, a pesar de los avances en química médica, que han permitido la síntesis de compuestos químicos, algunos medicamentos importantes de la medicina científica son todavía derivados directamente de las plantas por ser más económicos o por su complejidad. Las plantas son ricas en una gran variedad de metabolitos secundarios como taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides, los cuales, se ha observado que poseen propiedades antimicrobianas *in vitro* (Cowan, 1999; Ricker *et al.*, 1998).

La OMS reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también la relevancia a nivel económico al

ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tiene un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos. El regreso del interés científico sobre las plantas medicinales, investigando su riqueza y variabilidad química, ha impulsado una revalorización de su empleo en muchas partes del mundo, representando una forma complementaria de curar, en que el empirismo de la terapia queda atrás en función de la evidencia científica, armonizando la medicina tradicional con las terapias oficiales de cada país (OMS, 2000).

A nivel mundial se viene explorando y valorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos y variados agentes antimicrobianos; aproximadamente el 80 % de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales «La OMS apoya el uso de las medicinas tradicionales y alternativas cuando éstas han demostrado su utilidad y representan un riesgo mínimo» (OMS, 2007).

Con el presente trabajo se busca contribuir al conocimiento de la actividad antibacteriana y antifúngica de una planta medicinal conocida como “arrayán”, lo que ayudaría a controlar la presencia de microorganismos drogorresistentes, promover el manejo racional de los antibióticos y obtener un tratamiento confiable, seguro y de menor costo.

2. MARCO TEORICO

2.1 Las plantas como fuente de compuestos medicinales

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que data desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus experiencias en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Hill, 1965).

Las plantas contienen múltiples componentes químicos que se pueden tipificar como activos porque provocan diversos efectos o respuestas en el organismo, el perfil que los describe es referido como actividad biológica. En el contexto del uso tradicional de plantas medicinales, en general se propone que la actividad deriva de las combinaciones químicas presentes en la planta en su forma natural, en vez de considerar un componente específico como el responsable de la actividad biológica o de los beneficios atribuidos (Osorio, 2009).

El avance de la Fitoterapia como disciplina médica es cada vez mayor, representan casi el 25% del total de las prescripciones médicas en países industrializados; sin embargo en los países en desarrollo la participación de las plantas medicinales alcanza el 80% (OMS, 2007). La terapia a base de plantas medicinales constituye una vía alternativa para evitar los efectos adversos de los compuestos sintéticos tanto en el plano médico como en lo económico, ya que la ventaja de la medicina natural nos proporciona una sustancia química activa que presenta un equilibrio fisiológico más asimilable por el organismo que aquellos obtenidos por síntesis química. Actualmente, a pesar del gran

desarrollo alcanzado por la síntesis química, las plantas medicinales continúan siendo una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas o precursores de ésta, ya sea en forma de medicamento vegetal o materia prima para la industria farmacéutica; además han demostrado ser útiles como terapéuticos en la prevención y el tratamiento de las más diversas afecciones y enfermedades (Cowan, 1999; Obregón, 2003; Cañigeral *et al.*, 2003; Mantilla *et al.*, 2008; García, 2006).

En el contexto Latinoamericano y de acuerdo con la OMS, al hacer referencia a la medicina tradicional, se incluye la medicación a base de hierbas, materiales elaborados con hierbas, preparados con base de hierbas y productos acabados a base de hierbas que contienen ingredientes activos de plantas u otros materiales vegetales o combinaciones de las mismas (OMS, 2002). Además, por utilización tradicional de los medicamentos herbarios se entiende un empleo prolongado en el tiempo, bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz (OMS, 2000).

Nuestro país presenta una riqueza en la diversidad de plantas nativas, que es uno de los cimientos de la etnofarmacología y la medicina tradicional, siendo estas utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud (Carhuapoma, 2002; Mantilla *et al.*, 2008). Desde la época del Incanato hasta la actualidad; se ha transmitido de generación en generación y enriquecido por la integración cultural de la población nativa y migrante, permitiendo que se valide a nuestros ancestros que nos transmitieron sus conocimientos y dejaron como legado sus prácticas, legitimando el conocimiento tradicional (Mantilla *et al.*, 2008)

En el Perú, como en otros países, las plantas medicinales representan la principal herramienta terapéutica en medicina tradicional; el uso de estas se viene realizando en forma empírica y basada en la tradición; hoy poseen una base científica, por lo que va tomando mayor importancia la búsqueda de nuevas fuentes vegetales con actividad citotóxica, anti-inflamatoria, antitumoral, analgésica, antimalárica, antibacteriana, antifúngica entre otras (Alzamora *et al.*, 2001; Obregón, 2003; Mesa *et al.*, 2004; Mantilla *et al.*, 2008).

En la medicina tradicional peruana a la fecha se dispone de variados agentes antimicrobianos obtenidos de plantas que se han probado tanto *in vitro* como *in vivo* con buenos resultados (Cowan, 1999; Obregón, 2003; Cañigeral *et al.*, 2003). Un ejemplo de ello es *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) utilizado en humanos y animales domésticos como antiinflamatorio y desinfectante de heridas. *Piper tuberculatum* contiene las amidas isobutílicas, pirrolidina, dihidropiridona y piperidina que son las responsables de esta actividad (Silva *et al.*, 2002). Otra de las plantas que ha suscitado especial interés es *Allium sativum* “ajo” a quien se le atribuye propiedades antisépticas, antifúngicas, antibacterianas e hipocolesteromiantes, debido a que contiene una sustancia llamada aliína que ha demostrado ser activa tanto *in vitro* como *in vivo*, contra *Candida albicans*, algunas especies de *Trichomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, virus del Herpes simplex, de la influenza; y hongos, principalmente dermatofitos y levaduras patógenas al hombre (Yoshida *et al.*, 1987; Villar *et al.*, 1999). Otra planta con gran interés médico farmacéutico es *Caesalpinia spinosa* “tara” tiene actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, apoyando así el uso de esta planta en

la medicina popular para el tratamiento de infecciones bronquiales, como antiinflamatorio, en caso de sinusitis, infecciones vaginales y micóticas (Añanca ,2009).

Entre otras plantas empleadas en Medicina Tradicional en el Perú, son las productoras de aceites esenciales como *Eucalyptus globulus*, *Labill* “eucalipto”; *Cymbopogon citratus*, (D.C.) *Staff* “hierba luisa”; *Tagetes pusilla* Lag. “Anís serrano”; *Senecio tephrosioides*, *Turcz* “huamanripa” y *Lepechinia meyenii*, (Walp) *Epling* “salvia”(Alzamora *et al.*,2001).

2.2 Fitoterapia

Se define a la fitoterapia como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico (Cañigüeral *et al.*, 2003).

La base de los medicamentos fitoterápicos son las drogas vegetales y los diferentes tipos de productos que de ellas se obtienen. El término droga vegetal no debe confundirse con el de planta medicinal. La OMS definió en 1978 algunos conceptos como se indica a continuación:

A) Droga vegetal: Parte de la planta que contiene los principios activos y que se utiliza en terapéutica.

B) Planta medicinal: es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica.

C) Principios activos: Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico.

D) Medicamento: Toda sustancia medicinal (natural o sintética) con propiedades para prevenir, diagnosticar y curar una enfermedad. Se prescribe a una dosis y se ha elaborado de una forma correcta para su administración.

La fitoterapia utiliza drogas vegetales y preparaciones de dichas drogas en la forma farmacéutica más adecuada para su administración. En algunos países también involucran dentro del concepto de fitoterapia a los medicamentos conteniendo compuestos de origen vegetal químicamente puros, siempre que éstos posean un margen terapéutico amplio (Cañigüeral *et al.*, 2003).

2.3 EXTRACCIÓN

Para el estudio y la elaboración de medicamentos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo.

2.3.1 METODOS DE EXTRACCIÓN

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias, presentes en la planta y al propósito de la investigación.

Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Algunas veces es conveniente extraer los compuestos lipídicos del material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua (Domínguez, 1973; Lock, 1988).

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona (Domínguez, 1973; Lock, 1988).

Las extracciones pueden hacerse por:

- Extracción continua en soxhlet, en la cual el material seco se sitúa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal.
- Reflujo, el material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal.
- Maceración, el material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío

A continuación se citarán los métodos de extracción usados en la presente investigación.

2.3.2 TIPOS DE EXTRACCIÓN

Maceración

Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la especie vegetal con el solvente constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el solvente actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la especie vegetal, circulando a través en todas las direcciones y sentidos y extrayendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular (Selles, 1992).

Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de especie vegetal más solvente se lo protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse

continuamente (tres veces por día, aproximadamente); el tiempo de maceración es diverso, las distintas farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. A partir de este método no se consigue el agotamiento de las sustancias extraídas. “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la especie vegetal, tanto más favorable será el rendimiento” (Voigt, 1982).

Infusión

Es una solución diluida de constituyentes fácilmente solubles de la droga vegetal cruda, adecuada para drogas aromáticas, para evitar que los aceites volátiles se evaporen a otras temperaturas. La infusión se realiza sumergiendo las partes a utilizar de la planta en una cantidad de agua hirviendo, se deja reposar unos 15 minutos y se filtra a continuación mediante un tamiz o papel de filtro. (Domínguez, 1973; Lock, 1988, Osorio, 2009).

2.4 EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado de consistencia sólida, líquida o intermedia obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Voigt, 1982; Selles, 1992). Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en extractos fluidos, secos y blandos.

2.4.1 Extractos fluidos

Los extractos fluidos son extractos de especies vegetales en las cuales el solvente se ha evaporado en el rotavapor hasta conseguir una concentración de principio activo similar a

la concentración de principio activo en la droga original. Tienen consistencia líquida y se obtienen generalmente por maceración o percolación. El solvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. También pueden obtenerse por disolución de extractos secos. Los extractos fluidos se alteran fácilmente en contacto con la luz y el aire. Son muy utilizados para obtener formas líquidas (jarabes, pociones, gotas, entre otras) ya que se manipulan y dosifican con facilidad (Voigt, 1982; Osorio, 2009).

2.4.1 Extractos Secos

Son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del solvente y secado del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5% (Voigt, 1982). Presentan una concentración elevada de principio activo que la especie vegetal original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como solvente extractor se utiliza alcohol en diversas concentraciones y agua.

2.4.2 Extractos Blandos

Poseen una concentración de principio activo superior a la especie vegetal original y tienen consistencia semisólida parecida a miel espesa. El solvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular, por lo que no se utilizan (Voigt, 1982).

2.5 Pruebas fitoquímicas cualitativas preliminares

García (2006) señala que la palabra *fitoquímica* proviene del griego *Phyton-planta* es decir “*química de las plantas*” abarca la biosíntesis, metabolismo, distribución natural, función biológica, aislamiento, purificación y determinación de la estructura química de

tales compuestos; por tal razón, Valencia (1995) la define como “*el estudio de los constituyentes químicos de las plantas*”.

Los análisis fitoquímicos preliminares de caracterización, consisten en pruebas sencillas, sensibles y rápidas, que mediante una reacción química produce la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto y permiten identificar grupos químicos con potencial actividad biológica de las especies vegetales recolectadas. Estas reacciones pueden ser la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, mediante la utilización de reactivos específicos.

Mediante la caracterización fitoquímica se pueden identificar varios principios activos tales como: alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos, sesquiterpenos, lactonas, quinonas, cumarinas, saponinas, glucósidos, grupos carbonilo, aceites esenciales, aceites fijos, resinas entre otros (Domínguez, 1973; Lock, 1988).

Domínguez (1973), Lock (1988) y Valencia (1995) señalan que no existe un esquema definido para la realización de un análisis fitoquímico y que cada investigador, debe utilizar todas las herramientas y esquemas a su alcance y realizar su propia secuencia de investigación con la que se sienta más cómodo de trabajar.

2.6 Metabolitos

Son compuestos que permiten realizar a las células sus diferentes funciones. Están divididos en dos de acuerdo a su importancia para el metabolismo celular: metabolitos primarios y metabolitos secundarios.

2.6.1 Metabolitos primarios

Lock (1988) y Valencia (1995), describen a los metabolitos primarios como “*sustancias inertes universalmente distribuidas, que participan en la actividad celular de todo ser viviente*”. Valencia (1995) afirma además que tales sustancias “*no tienen ninguna actividad farmacológica definida*”. Estos metabolitos están constituidos por:

- Lípidos.
- Ácidos carboxílicos del ciclo del ácido cítrico.
- Aminoácidos
- Azúcares comunes y derivados.
- Polímeros de carbohidratos (celulosa, almidón).
- ATP y DPN.
- Materias colorantes.

2.6.2 Metabolitos secundarios

Lock (1988) los describe como “*compuestos químicos de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida y característica a cada planta*”. Según Lock (1988), Valencia (1995) y García (2006), estos compuestos no son indispensables para el funcionamiento celular de las plantas y, generalmente, son éstos los responsables de la acción terapéutica de las mismas. Lock (1988) los denomina por ello “*artículos de lujo de la planta*” y Valencia (1995) agrega que dichos productos “*no son finales ya que posteriormente pueden sufrir más cambios*”. Su presencia o ausencia en la planta está determinada por varios factores: el suelo, las condiciones climáticas, la estación, el momento del día, etc.

Si bien estos metabolitos no son esenciales para el funcionamiento celular, cumplen otras funciones específicas para cada planta donde actúan: como mecanismos de defensa, agentes polinizadores, sustancias de reserva, cicatrizantes para sus propias heridas, etc (Valencia, 1995).

Algunos de estos metabolitos, con reconocida acción terapéutica son: alcaloides, taninos terpenos, saponinas, quinonas, compuestos fenólicos, etc. A continuación se describen algunos de estos compuestos considerados para la presente investigación.

2.6.2.1 Alcaloides

Término aún no definido a pesar de conformar el grupo más numeroso de todos los metabolitos secundarios. Según Lock (1988) y Valencia (1995) se conocen entre 5000 – 5500 alcaloides. Valencia (1995) afirma que el término “alcaloide” deriva de “álcali vegetal”, ya que se usó primero para designar a un grupo de bases de origen vegetal. Lock (1988) los define como: “sustancias básicas que contienen uno o más átomos de Nitrogeno como parte de un sistema cíclico, que manifiestan significativa actividad farmacológica y que han sido sintetizados de aminoácidos como precursores”. Valencia (1995) afirma que una propiedad común en todos los alcaloides es su “acción farmacológica”, ya que “con una dosis mínima de ellos se obtiene su máxima acción, y así, muchos son venenosos”.

En las plantas, los alcaloides se encuentran formando sales solubles como insolubles, y generalmente se combinan con los ácidos málico, oxálico, succínico, cítrico, tartárico, tánico, aconítico, mecónico, quínico y caféico. Además, algunas veces los alcaloides

están unidos a azúcares formando glicolacaloides, otras están en forma de amidas, de ésteres o de óxidos de nitrógeno (Valencia, 1995).

2.6.2.2 Antocianinas

Las antocianinas están basadas químicamente en una única estructura aromática, aquella de la cianidina y todas se consideran derivadas de ella por adición o sustracción de grupos de hidroxilo, por metilación o por glicosidación. Ellas son intensamente coloreadas y solubles en agua, se considera que tienen como función en la planta ser atractores de insectos y aves para los procesos de polinización y disseminación de semillas.

Las antocianinas como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria aunque la literatura reporta a la fecha más de 250 antocianinas, se hace necesaria una mayor investigación para darles un mejor uso y sean más competitivas como alternativas viables a los colorantes sintéticos hoy en uso.

El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes alimenticios, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano (Wong, 1995).

2.6.2.3 Quinonas y antraquinonas

Bruneton (2001) describe a las quinonas como “compuestos oxigenados que corresponden a la oxidación de derivados aromáticos”, señala que también puede encontrarse el agrupamiento quinónico en diferentes tipos de metabolitos secundarios,

como por ejemplo flavonoide-quinonas. Valencia (1995) divide a las quinonas en cuatro grupos de acuerdo con su estructura: benzoquinonas, naftaquinonas, antraquinonas e isoprenoquinonas. Los tres primeros son compuestos hidroxilados con propiedades fenólicas.

García (2006) señala que “colaboran con la pigmentación de muchas plantas y animales” y que “debido al equilibrio quinona-hidroquinona, las quinonas regulan los procesos de oxidación-reducción” considerándose algunas de sus estructuras como coenzimas.

2.6.2.4 Saponinas

Según Domínguez (1973) la palabra saponina proviene del latín “sapon” que significa “jabón”, ya que estas moléculas tienen la propiedad de producir una espuma jabonosa al agitarse en una solución acuosa, propiedad que se utiliza para su identificación en un extracto vegetal. Valencia (1995) las describe como “glicósidos de alcoholes tanto triterpenoides como esteroides, con una cadena lateral espiroacetal”; en tanto Lock (1988) indica que las saponinas triterpenoides están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, difiriendo entre ellas por el número y tipo de unidades de azúcar unidas a su respectiva “sapogenina”. Tanto Lock (1988) como Valencia (1995) coinciden en que su importancia radica en su utilización como materia prima para la elaboración de hormonas, principalmente aquellas saponinas esteroidales.

2.6.2.5 Esteroides y triterpenos

Los triterpenoides son compuestos con esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogenéticamente del escualeno. Son de estructura relativamente compleja generalmente tetraciclicos o pentaciclicos y pueden contener grupos hidroxilo cetona o aldehído y ácido carboxílico (Lock, 1988).

Muchas de las plantas deben a sus compuestos terpénicos, sus propiedades aromáticas inmersas en los aceites esenciales. Estos compuestos presentan gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado: acción citotóxica, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antiséptica, inhibidoras del crecimiento bacteriana, entre otras (Villacís, 2009). Los esteroides, biogenéticamente muy relacionados a los triterpenoides y con un esqueleto cíclico base al igual que los triterpenoides tetracíclicos, pueden ser clasificados como esteroides, saponinas esteroidales, glucósidos cardíacos, esteroalcaloides y las llamadas hormonas esteroidales (Lock, 1988).

2.6.2.6 Cumarinas

Las cumarinas son α -pirona o α -cromonas y por lo tanto poseen el mismo esqueleto carbonado que los ácidos cinámicos; son compuestos ampliamente distribuidos en las plantas, se encuentran en todas las partes de la planta principalmente desde la raíz a flores y frutos siendo más abundantes estos últimos.

En los últimos años el desarrollo de los procesos de aislamiento y análisis estructural han conducido a un marcado incremento en el número de cumarinas aisladas de plantas, lo que conlleva a un gran interés por el amplio rango de actividad biológica que muchas cumarinas han presentado como por ejemplo acción anticoagulante y antibacteriana, acción antibiótica de la novobiocina, la aguda hepatotoxicidad y carcinogenicidad de ciertas aflatoxinas, acción astrógena, acción fotosensibilizadora, acción insecticida entre otros; cabe destacar también las aplicaciones de las cumarinas como saborizantes y en perfumería (Lock, 1988).

2.6.2.7 Flavonoides

Diversos autores como Domínguez (1973), Valencia (1995), Bruneton (2001) señalan que los flavonoides son sustancias cuyas estructuras derivan del núcleo 2-fenil-benzopirona, conocido también como *flavona*. Su esqueleto carbonado tiene la forma C6-C3-C6 y de acuerdo con el nivel de oxidación del anillo central de pirano se pueden dividir en varias clases, siendo las más importantes los flavonoles (como la quercetina) y las antocianidinas (como la cianidina) (Valencia, 1995).

Están ampliamente distribuidos en las plantas, ya sean libres o como glicósidos (Domínguez, 1973; Lock, 1988; Valencia, 1995) en el mesófilo y epidermis de las hojas, en la cutícula epidérmica de los frutos y en otros órganos, siendo más abundantes en órganos jóvenes (Bruneton, 2001).

La acción farmacológica es también extensa y variada, son bien conocidas sus actividades como la fragilidad capilar, dilatadores de las coronarias, espasmolítica, antihepatotóxica, colerética, estrógena y diurética. Se destaca así mismos la actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de las isoflavonas (Lock, 1988).

Valencia (1995) señala además otras funciones importantes para la medicina, tales como: son potentes inhibidores de algunos sistemas enzimáticos, tienen una función protectora y de resistencia contra las enfermedades, pueden servir como marcadores químicos en los estudios biosintéticos y de distribución taxonómica de las plantas superiores, etc.

2.6.2.8 Taninos

Bruneton (2001) define a los taninos como “compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular entre 500 – 3000, que presentan la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas”. Los clasifica en dos grupos:

- T. condensados (proantocianidoles): Polímeros de unidades flavónicas, la mayoría de las veces ligadas entre ellas por enlaces C4-C8. Son resistentes a la hidrólisis.
 - T. hidrolizables: Son ésteres de la glucosa (o de compuestos semejantes) y de ácidos fenoles: ácido gálico (T. gálicos) o ácido hexahidroxidiférico y sus derivados (T. elágicos).
- Al igual que el resto de los metabolitos secundarios, no se sabe con exactitud cuál es su función dentro de la planta. Valencia (1995) señala que la energía producida por la oxidación de estos taninos es utilizada para realizar sus procesos metabólicos. También que por tener acción antiséptica las previenen del daño causado por insectos y hongos.

Son utilizados en la curtiembre gracias a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas, al igual que en la industria textil por su capacidad de reaccionar con las sales férricas, los cuales dan lugar a productos negro-azulados adecuados para tintes. Igualmente son utilizados como mordientes para la aplicación de tintes en tejidos, coagulantes de gomas, o aprestos para papeles o sedas (Villacís, 2009).

Valencia (1995) y Bruneton (2001) señalan que en medicina se prescriben por su acción astringente, hemostática, antiséptica y tonificante. También son considerados antídotos para diversos envenenamientos por alcaloides tóxicos, gracias a su propiedad de formar complejos con los mismos. Se emplean en el tratamiento de procesos diarreicos, inflamaciones de la piel y de la mucosa bucofaríngea, alteraciones gastrointestinales, como cicatrizante, hemostático, antioxidante, antibacteriano, entre otras.

2.7 Familia Myrtaceae: Árboles, arbustos o subarbustos, generalmente perennifolios, ricos en aceites esenciales, fundamentalmente de compuestos terpénicos y frecuentemente con células secretoras taníferas, dispersas perteneciente al orden Myrtales. Alrededor de 140 géneros, con más de 3000 especies, distribuidas principalmente en las zonas templadas, tropicales y subtropicales del mundo (Castroviejo, 1997).

La familia Myrtaceae es reconocida en el Perú por presentar 20 géneros y 165 especies la mayoría arbustos y árboles. Las Myrtaceae endémicas se encuentran principalmente en las regiones Bosques Húmedos Amazónicos y Mesoandina, entre los 100 y 3600 m de altitud (Kawasi y Holst, 2006).

Se han realizado algunos estudios para evaluar la actividad antimicrobiana con esta familia de plantas, así tenemos:

➤ **A nivel internacional tenemos:**

Gómez en el 2010 realizó un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales del Ecuador y determinó que el extracto etanólico de *Myrciantes hallii* “arrayán” mostró moderada actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. Este estudio apoya con validación científica, el uso empírico de *Myrciantes hallii* “arrayán” para el tratamiento de enfermedades bucofaríngeas.

Goncalves y colaboradores en el 2001 reportan que el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray. “arrayán” posee tres componentes principales (α -pineno, 1,8-cineol y linalol) probablemente responsables de la actividad antimicrobiana, frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* CECT 484, *Candida albicans* CECT 1394, *Cryptococcus neoformans* CECT 1078, *Cladosporium cladosporioides* CECT 2111 y *Aspergillus fumigatus* CECT 2071, estos resultados justifican el uso de esta planta en la medicina tradicional.

Labbe *et al.* (2002), en un estudio químico bioguiado del extracto metanólico de hojas frescas de *Luma chequen*, condujo al aislamiento de tres tipos de flavonoides, llamados lumaflavonoides A (1), B (2) y C (3). Las fracciones 1 y 2 mostraron mejor actividad fungistática frente a la cepa de *Botrytis cinerea*.

Maldonado en el 2008 reportó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* “arrayán”, los análisis realizados comprueban su acción bactericida sobre microorganismos Gram (+), principalmente por la actividad del eucaliptol sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* que son patógenos típicos de las vías respiratorias superiores. Así, estos datos se convierten en una base para estudios posteriores dirigidos a la formulación de preparaciones de uso tópico, especialmente para la limpieza y la desinfección de la cavidad oral.

Bodero en el 2010 concluyó que los extractos fluidos de *Myrcianthes rhopaloides* “arrayán” y *Salvia squalens* “Pumín” contienen principios activos implicados en la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* aislados de infecciones periodontales, esto respaldaría el conocimiento

ancestral de poseer propiedades antimicrobianas, antisépticas, útiles en caso de inflamación de las encías y limpieza dental.

Pío y colaboradores en el 2013 determinaron la actividad antibacteriana de extractos de frutos de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth “nanchi”, *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied. “arrayán” y *Crescentia alata* Kunth “áyale” mediante el ensayo de micro-dilución en caldo, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB), de los extractos de frutos (hexánico, EH; clorofórmico, EC; y metanólico, EM) contra 21 bacterias patógenas humanas. Los EH de arrayán y áyale mostraron la mayor actividad (CMI 0,25-2 mg/mL; CMB 0,5-16 mg/mL) contra enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*). El EM de arrayán fue el más activo contra bacterias Gram positivas, presentando *Staphylococcus aureus* la mayor sensibilidad (CMI 2 mg/mL; CMB 2-4 mg/mL). Estos resultados apoyan el uso tradicional de estos materiales en padecimientos asociados al tratamiento de infecciones bacterianas.

Lizcano y Vergara en el 2008 reportaron que el aceite esencial obtenido de las hojas de *Myrchiantes rhopaloides* “arrayán negro” presentó actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y un hongo fitopatógeno *Alternaria sp.* Estos resultados confirman que el aceite esencial evaluado de las hojas de *Myrchianthes rhopaloides* poseen actividad antibacteriana y antifúngica como lo han reportado otras especies vegetales de la familia Myrtaceae.

➤ **A nivel nacional:**

Estudios realizados en Pucallpa por Wen y colaboradores en el 2011, señalan que el extracto etanólico de *Psidium acutangulum* “guayaba coronilla” perteneciente a la familia Myrtaceae mostró una buena actividad antifúngica *in vitro* frente a *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii* y *Trychophyton mentagrophytes*.

Huamaní y Ruiz en el 2005 realizaron una investigación de la actividad antifúngica de 10 plantas medicinales peruanas, obteniéndose que los extractos etanólicos de hojas de *Piper* spp “Matico”, *Psidium guajava* L. “guayaba” especie vegetal que pertenece a la familia Myrtaceae, corteza y hojas de *Schinus molle* L. “molle”, *Juglans neotropica* Diels “nogal” presentaron actividad antifúngica frente a una cepa clínica de *Candida albicans*.

Otro estudio importante es el de Alzamora y colaboradores en 2001 realizaron estudios de cinco plantas empleadas en Medicina Tradicional en el Perú: *Eucalyptus globulus* Labill “eucalipto” perteneciente a la familia Myrtaceae; *Cymbopogon citratus* (D.C.) Staff “hierba luisa”; *Tagetes pusilla* Lag. “Anís serrano”; *Senecio tephrosioides* Turcz “huamanripa” y *Lepechinia meyenii* (Walp) Epling “salvia”, obteniendo resultados que permiten validar el uso popular del “anís serrano” y de la “hierba luisa” en el tratamiento de afecciones intestinales, como la salmonelosis y el cólera; Asimismo el uso tradicional de la “huamanripa”, el “eucalipto”, la “hierba luisa” y la “salvia” en el tratamiento de procesos respiratorios causados por bacterias como *Staphylococcus aureus*.

2.8 Descripción de la especie vegetal

2.8.1 Ubicación Taxonomía

Según el sistema de clasificación de A. Cronquist (1981), determinado por Dra. Elida Carrillo Fuentes del Laboratorio de Taxonomía Vegetal del Departamento Académico de Botánica - Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA

-CLASE : MAGNOLIOPSIDA

-SUBCLASE : ROSIDAE

-ORDEN : MYRTALES

- FAMILIA : MYRTACEAE

-GÉNERO : ***Luma***

-ESPECIE : ***Luma chequen*** (Molina) A. Gray.

NOMBRE VULGAR: “arrayán”

SINONIMIA VULGAR: “wallpuma”, “rayán castilla” y “luma”.

SINONIMIA CIENTÍFICA : *Eugenia chequen* Molina, *Eugenia myrtomimeta*

Diels, *Myrceugenella chequen* (Molina) Kausel, *Myrceugenella chequen* var. *myrtomimeta* (Diels) Kausel (Brako y Zarucchi,1993)

2.8.2 Descripción botánica

Planta arborescente, con altura entre los 5 a 6 m y cobertura de 5m de diámetro. Es coposo, con el follaje denso y siempre verde. La copa es globosa y va desde el primero segundo tercio (Sotta, 2000; Carhuapoma, 2002; Reynel & Marcelo, 2009).

Tallo erguido, leñoso, ramificado desde la base. La corteza externa es lisa, de color marrón claro. La corteza interna es blanquecina, con olor tenue y agradable.

Hojas: son simples, opuestas y decusadas. sin estipulas, los peciolo son muy cortos, de 1 a 2 mm de longitud, limbo ovoide y coriáceo, 0,5 a 4,0 cm de longitud y 0,5 a 2,0 cm de ancho, con el ápice agudo, el borde entero y la base obtusa. Las hojas no tienen pelos y tienen un olor agradable al ser estrujadas, como se observa en la Figura 1.

Flores: solitarias, axilares, hermafroditas, blancas, actinomorfas y tetrámeras; estambres numerosos, libres, en varios verticilos, filamentos inflexos en el capullo, anteras versátiles introsas; ovario ínfero con placenta axilar, óvulos anátropos, estilo simple y estigma capitado, como se observa en la Figura 2.

Fruto: drupa, con escasas semillas y escaso endosperma.

Observaciones para el reconocimiento de la especie

Esta especie se reconoce con facilidad por sus hojas pequeñas, lustrosas y glabras (sin pelos), de olor agradable al ser estrujadas, así como por sus flores blancas de tamaño mediano.



Figura 1.- Planta de *Luma chequen* “arrayán”.



Figura 2.- Detalles de la floración y flor de *Luma chequen*

2.8.3 Distribución geográfica y hábitat

Crece desde los 2500 a los 4000 m de altitud en los Andes de Sudamérica Central, entre Perú, Bolivia y Chile. En el Perú, se distribuye entre los departamentos de Ancash, Pasco, Lima, Junín, Ayacucho, Arequipa y Cusco, con predilección hacia el Sur. Su población se ve favorecida en lugares de alta humedad, a orillas de los ríos y de los suelos profundos y arenosos (Cronquist, 1981; Reynel & Marcelo, 2009).

2.8.4 Fenología

Los episodios de floración han sido registrados mayormente entre marzo y junio; la fructificación entre enero y mayo (Reynel & Marcelo, 2009).

2.8.5 Investigación fitoquímica

De acuerdo con los estudios realizados por Muñiz (1992); Carhuapoma (2002); Jaramillo *et al.*, (2004), contiene los siguientes metabolitos: flavonoides (quercetina, rutina y quercetin-3-metil éter), taninos, triterpenos y esteroides, aceites esenciales (1,8-cineol, mirtol), leucoantocianidinas y catequinas, fenoles libres, resinas, principio amargo, vitamina C, ácidos (cítrico, tánico y málico), hidrocarburos cafeínico y heterósidos.

Goncalves *et al.* (2001), analizó los componentes del aceite esencial de *Luma chequen* "arrayán" y encontró en mayor cantidad los monoterpenos con 90,1%, de los cuales α -pineno (57,1%), 1,8-cineol (12,1%) y linalol (5,5%); y en caso de los sesquiterpenos sólo 3,1%.

Carhuapoma en el 2006 reporta hidrocarburos monoterpénicos (68,8%), con sus mayores componentes el α -pineno (57,3%) y β -pineno (6,2%); fracción de hidrocarburos oxigenados (18,9%), destacando 1,8 cineol (7,5%), linalol (3,7%) y *trans*-verbenol (2,2%); fracción sesquiterpénica (3,0%), con el β -selineno (1,3%) y óxido de b-cariofileno (0,9%); y la fracción no terpénica (3,0%). De acuerdo a estos resultados obtenidos sugiere que el aceite esencial de *Luma chequen* "arrayán" posee actividad antioxidante, debido a la estructura de sus constituyentes químicos.

2.8.6 Usos etnofarmacológicos del "arrayán" en el Perú

La información etnofarmacológica refiere diversos usos de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "arrayán" en la medicina popular; la ingesta por vía oral de la infusión o decocción de las partes aéreas de esta planta se utiliza en Sudamérica para mitigar la tos, la indigestión y las diarreas, antiinflamatorio, antimicótico, las afecciones pulmonares y afecciones bronquiales, expectorante, astringente, antiséptico, además el follaje es

empleado como aromatizante y saborizante en la cocina, y como condimento en la preparación de embutidos (jamones y salchichería) (Reynel & Marcelo, 2009).

Arellano en 1992 publicó un libro de plantas medicinales preparado como una ayuda a los profesionales de la salud de todos los niveles de atención, haciendo énfasis en el nivel de la Atención Primaria de Salud describiendo así al “arrayán” como analgésico, antihelmíntico, antiinflamatorio de la boca y la garganta, emenagogos, galactogogos, oxitócicos, relajante uterino y contra la leucorrea.

Mantilla y Olazábal en el 2008 realizaron un estudio de las plantas medicinales en el Cusco reportando que *Luma chequen* “arrayán” es utilizado por los pobladores para el dolor de cabeza, dolor de estómago, expectorante y astringente, para la tos, gripe, reumatismo, el mal aliento, fiebre y además para bañar a los muertos y así conservarlos.

Según Goncalves *et al.*, (2001), el *Luma chequen* es una planta nativa de Perú, que sus hojas y meristemas apicales de tallo son usados por los locales para los tratamientos de la tos, dolores de muela, desórdenes gastrointestinales e infecciones posparto.

Muñiz (1992), en un trabajo etnobotánico menciona sus propiedades antirreumática, antidiarreico, antiséptico, astringente, balsámico, hemostático, vasoconstrictor, antineurálgico, antiinflamatorio y analgésico.

Según Mostacero y col. (2002), las hojas aromáticas son usadas en forma de infusión debido a sus propiedades carminativas.

Sotta (2000), afirma que en el departamento de Arequipa las ramas se usan para baños en caso de “mal de aire” y después del parto. Asimismo, refiere que sus hojas frescas son usadas como condimento y aromatizante para preparar embutidos.

En algunos pueblos de los departamentos del Sur de Perú como Ayacucho, Apurímac y Cuzco las hojas y ramas jóvenes de “arrayán” son usadas como “agua de arrayán”, para evitar la putrefacción de tejidos postmortem conservándolas por años. También se le da un uso costumbrista, para armar coronas en todo los santos, para acompañar ramos de flores para ofrendar a ídolos y en ceremonias nupciales (Carhuapoma, 2002; Mantilla *et al.*, 2008).

2.9 Infecciones nosocomiales

Las infecciones nosocomiales (IN) son aquellas que no están presentes en periodo de incubación cuando el paciente ingresa al hospital, y en general se considera que éstas se presentan posterior a las 72 horas de ingreso al centro asistencial. Las infecciones nosocomiales son consecuencia directa de la atención integral a pacientes hospitalizados relacionadas con diversos factores, como foco de infección, tipo de microorganismo aislado, enfermedades concomitantes, tratamiento antibiótico y contaminación de soluciones intravenosas, determinan la evolución de los paciente; además del medio ambiente juega un papel muy importante ya que a partir de él se diseminan al huésped por diferentes vías los patógenos nosocomiales, que se caracterizan por una mayor virulencia y resistencia antimicrobiana (Ayala *et al.*, 2006).

Una IN prolonga el tiempo de estancia hospitalaria, incrementa la mortalidad, eleva los costos de atención y afecta la calidad de vida del individuo durante la recuperación de su

enfermedad de base. Estas infecciones afectan más las áreas hospitalarias donde se atienden pacientes en estado crítico como las salas quirúrgicas, de inmunocomprometidos o UCI (Reimer *et al.*, 1997; Pfaller, 2007; Pemán *et al.*, 2011).

2.10 Hemocultivo

Un hemocultivo se define como el cultivo microbiológico de una muestra de sangre obtenida por punción venosa sencilla o acceso intravenoso. Es un estudio recomendado para confirmar una bacteriemia o fungemia cuando ésta se sospecha en pacientes con o sin foco obvio de infección. Un cultivo de sangre positivo sugiere un diagnóstico definitivo en la orientación de una terapia eficaz contra organismos específicos, así como el estudio de patrones de resistencia a antimicrobianos en la terapia médica (Reimer *et al.*, 1997; Pemán *et al.*, 2005).

2.11 Bacteriemia

El concepto de bacteriemia es esencialmente microbiológico, y se define como la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo, independientemente de su magnitud, persistencia o respuesta que provoca en el huésped y que se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en los hemocultivos. La invasión del torrente circulatorio por microorganismos puede producirse desde un foco infeccioso extravascular mediante el sistema linfático y directamente desde focos intravasculares (endocarditis, infección de catéteres intravasculares) (Reimer *et al.*, 1997; Loza *et al.*, 2003).

La bacteriemia nosocomial es aquella en la que un paciente adquiere durante un ingreso hospitalario. El criterio que suele utilizarse para diferenciar un episodio de bacteriemia intrahospitalaria de una extrahospitalaria es el periodo de tiempo transcurrido entre el ingreso en el hospital y el momento en el que se extraen los hemocultivos positivos. La

mayoría de los estudios de bacteriemia suelen considerar un periodo de 48 a 72 h (Loza *et al.*, 2003).

Las bacteriemias pueden presentar 3 patrones clínicos (Reimer *et al.*, 1997):

- 1) transitoria, la que ocurre luego de la manipulación de tejidos infectados (abscesos, forúnculos, celulitis), instrumentación sobre superficies mucosas infectadas (extracción dentaria, cistoscopia, cateterización uretral, aborto aspirativo) y cirugía de sitios contaminados.
- 2) intermitente, debida a abscesos intraabdominales o viscerales no drenados, osteomielitis, artritis, meningitis, neumonía.
- 3) continua, es la característica principal de la endocarditis bacteriana y otras infecciones endovasculares.

Los focos más frecuentes de bacteriemia son el tracto genitourinario, los abscesos, las heridas quirúrgicas, el tracto biliar y los catéteres intravasculares, aunque hasta en un 25% de los casos su foco originario es desconocido. La mayoría de los microorganismos son capaces de invadir el torrente circulatorio. En la actualidad los Grampositivos, especialmente estafilococos y enterococos, igualan o superan en frecuencia a los Gramnegativos (Loza *et al.*, 2003).

En cuanto a la etiología de la bacteriemia y su relación con la mortalidad, los microorganismos que se han asociado con mayor mortalidad son: *S. aureus*, SARM, *Pseudomonas aeruginosa*, enterobacterias productoras de BLEE y las levaduras del género *Candida* (Hoyos *et al.*, 2007; Pfaller, 2007; Tibavizco *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2011).

2.12 Candidemia

La candidemia se define como la presencia de *Cándida* spp. en el torrente sanguíneo evidenciada mediante el aislamiento del agente en el hemocultivo. Existen tres formas clínicas de presentación: a) candidiasis diseminada aguda, b) candidiasis diseminada crónica, c) candidemia transitoria (Pemán *et al.*, 2005; Pfaller, 2007; Pemán *et al.*, 2011).

La incidencia de candidemia en pacientes hospitalizados ha experimentado un incremento progresivo en los últimos años. Este hecho se debe a un incremento de pacientes en riesgo de sufrir esta complicación, pacientes ingresados en las UCI, posquirúrgicos, neutropénicos, el uso de diferentes métodos invasivos de diagnósticos y terapéuticos (catéteres endovenosos, intubación orotraqueal, cirugía, nutrición parenteral, neonatos prematuros e inmunodeprimidos en general). Desde el punto de vista clínico la candidemia se manifestará como sepsis, sepsis grave o shock séptico de origen nosocomial (Pfaller, 2007).

Las candidemias nosocomiales constituyen infecciones de alta gravedad, con una creciente incidencia y elevada mortalidad, reportes recientes sitúan a la candidemia entre el 4º y 5º lugar de los aislados positivos de hemocultivos en pacientes hospitalizados, responsables del 8% a 15% de sepsis nosocomiales. Las especies pueden causar infección sistémica en pacientes inmunocomprometidos, recién nacidos y pacientes en UCI, debido a su gran capacidad de adaptación a diferentes nichos hospederos (Pfaller, 2007).

2.13 Principales patógenos aislados de hemocultivos.

La sepsis puede tener origen en infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias.

Microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* son responsables de bacteriemias verdaderas en más del 90% de los casos. Por el contrario, es dudoso el papel que representan los microorganismos que forman parte de la microbiota del paciente como los estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus* del grupo *viridans*, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* spp. y algunas especies de *Clostridium* que, en conjunto, suponen menos del 5% de las bacteriemias verdaderas. Sin embargo, algunos de estos microorganismos pueden ser responsables de verdaderas bacteriemias en algunas situaciones y por tanto, su identidad no es un dato suficiente para establecer el criterio de significación clínica, ya que la mayoría de ellos continúa representando contaminaciones más que bacteriemias verdaderas (Loza *et al.*, 2003; Ayala *et al.*, 2006).

Asimismo también podemos encontrar microorganismos infrecuentes, de difícil aislamiento y crecimiento, ya que la mayoría de estos necesitan medios de cultivos especiales por sus requerimientos nutritivos y su incubación debe ser prolongada debido a su lento crecimiento. Algunos de estos agentes etiológicos incluyen a *Brucella*, *Francisella tularensis* espiroquetas del género *Leptospira*, *Bartonella*, *Vibrios*, gérmenes encapsulados, *Micoplasmas*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *Micobacterias*, parásitos del género *Leishmania*, hongos como *Histoplasma capsulatum*, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*. *Aspergillus* y los virus (Loza *et al.*, 2003).

Para seleccionar los patógenos utilizados en la presente investigación, se tomó en consideración el trabajo de Flores *et al.*, (2011) los cuales realizaron un reporte de datos sobre la susceptibilidad antimicrobiana en el servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara entre los años 2009 y 2010. Evidenciándose así que los principales patógenos aislados de hemocultivos fueron los siguientes que describen a continuación.

Escherichia coli

E. coli es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran tejidos humanos y órganos, responsables de producir más del 80% de las infecciones del aparato urinario, así como la mayoría de las infecciones nosocomiales. *E. coli* es el gram negativo más frecuentemente implicado en bacteriemias tanto adquiridas en la comunidad como nosocomiales, las bacteriemias por *E. coli* con betalactamasa de espectro extendido (BLEE) constituyen una entidad clínica grave que, al igual que otras infecciones causadas por microorganismos multirresistentes, supone un reto a la hora de instaurar un tratamiento antibiótico correcto que no favorezca el desarrollo de resistencias por otros mecanismos (García *et al.*, 2011).

Klebsiella pneumoniae

Las infecciones nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae*, está asociada a una alta morbilidad y mortalidad. Se estima que el género *Klebsiella* es el responsable del 8% de las infecciones nosocomiales bacterianas en los Estados Unidos y en Europa, lo cual lo sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales (Reimer *et al.*, 1997).

Klebsiella pneumoniae causa principalmente bacteriemia o infección del torrente sanguíneo, neumonía, infección urinaria, de herida quirúrgica y de tejidos blandos, enterocolitis, meningitis, conjuntivitis, absceso renal, endocarditis y bacteriemia asociada a catéter, entre otras y es el segundo agente causal, tras *E. coli*, de septicemias nosocomiales por bacterias gram negativas (Reimer *et al.*, 1997; Koneman *et al.*, 2008).

La resistencia de *Klebsiella* spp a cefalosporinas de tercera generación va en aumento. En los últimos años se ha detectado bacteremias por *E. coli* o *Klebsiella* spp con resistencia múltiple a ceftazidima, Cefotaxime, Cefpodoxima y Aztreonam, lo que indica la presencia de resistencia secundaria a BLEE (Hoyos *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es el mayor causante de bacteriemia, asociada con una alta morbilidad y mortalidad, representa cerca de 11% a 33% de las bacteriemias hospitalarias y un porcentaje importante de las adquiridas en la comunidad, con una tasa de complicaciones cercana a 50% (Tibavizco *et al.*, 2007).

La carga de bacteriemia por *Staphylococcus* spp, particularmente *S.aureus* resistente a meticilina (SARM), en términos de costo y uso de recursos es alta. *S.aureus* resistente a meticilina (SARM) se asocia tradicionalmente a infecciones nosocomiales o relacionadas con la asistencia sanitaria (RAS), esto es debido a la capacidad de *S. aureus* de infectar catéteres endovenosos y dispositivos protésicos intravasculares. En los hospitales la tasa de infección/colonización por SARM representa el 25% de los aislamientos de *S. aureus*, siendo más alta en hospitales de alta complejidad asistencial y en determinadas áreas como las UCI (Tibavizco *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2011)

Este cambio en la epidemiología de bacteriemia por *S. aureus*, en combinación con la virulencia inherente del patógeno, está impulsando una urgente necesidad de mejorar las estrategias y mejores antibióticos para prevenir y tratar la bacteriemia por *S. aureus* y sus complicaciones (Tibavizco *et al.*, 2007; Paz *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2010)

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus epidermidis fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un importante patógeno nosocomial debido al uso incrementado de dispositivos médicos como catéteres endovenosos de permanencia prolongada, injertos vasculares, válvulas cardiacas y articulaciones protésicas, representando el 24% de los patógenos nosocomiales encontrados en la sangre (Finkelstein *et al.*, 2002); además es considerado el agente más común de bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos.

Staphylococcus epidermidis alcanza el torrente circulatorio mediante los dispositivos de acceso vasculares infectados. Los pacientes en los que desarrolla bacteriemia estafilocócica relacionada con catéteres suelen tener dispositivos de acceso múltiples ubicados para el tratamiento de cáncer o para la administración de agentes quimioterapéuticos para el trasplante de medula ósea (García *et al.*, 2003).

S. epidermidis, dado que es un microorganismo de transmisión nosocomial, tiene una alta tasa de resistencia a múltiples antibióticos. Cerca del 90% producen betalactamasas, mientras que 60% al 80% son resistentes a la meticilina (Garrett *et al.*, 1999).

Género *Candida*

Las levaduras del género *Candida* son comensales humanos muy ubicuos, que pueden causar infección oportunista en casi cualquier localización del organismo. Existen más de 150 especies de *Candida*, de ellas aproximadamente 17 se consideran patógenas habituales para el ser humano. De las 17, sólo 5 producen más del 90% de las infecciones invasivas estas son: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*. Otras menos frecuentes son: *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. norvegensis*, *C. dubiniensis*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides* y *C. pelliculosa*. *C. dublinensis* es una especie de reciente descripción que antes se incluía dentro de *C. albicans* (Reimer *et al.*, 1997; Pfaller, 2007; Pemán *et al.*, 2011).

La virulencia y patogenicidad de algunas de estas especies de *Candida* no *albicans* han mostrado un aumento importante en la mortalidad, además de implicar un reto terapéutico ante el aumento de resistencia a los tratamientos usados (Pfaller, 2007; Nuri *et al.*, 2011; Pemán *et al.*, 2011).

Candida albicans

C. albicans es la especie aislada con una mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre un 90% y un 100% de las cepas aisladas de muestras de mucosa, y entre un 50% y 70% de las cepas procedentes de pacientes con infecciones septicémicas. Normalmente en candidemias y enfermedad invasora, *Candida albicans* es la más frecuente, sin embargo, debido al uso indiscriminado de antibióticos y azoles, el

aislamiento de *Candida no albicans* es cada vez más común (Pfaller., 2007; Pemán *et al.*, 2011).

Candida tropicalis

Candida tropicalis es una de las principales causas de septicemia y candidiasis diseminada, especialmente en pacientes con linfoma, leucemia y diabetes. Es el segundo patógeno médico más frecuentemente encontrado, próximo a *C. albicans*, y se encuentra formando parte de la flora normal mucocutánea (Bonifaz, 2010). *Candida tropicalis* fue inicialmente catalogada como susceptible a Fluconazol y Anfotericina B, sin embargo reportes en los últimos cinco años indican un rápido desarrollo de resistencia a estos agentes (Bonifaz, 2010; Nuri *et al.*, 2011; Péman *et al.*, 2011)

Candida parapsilosis

Candida parapsilosis ha emergido como un patógeno importante de candidemia, además de estar asociado de manera creciente a un amplio espectro clínico de infecciones. En el entorno clínico esta levadura oportunista se ha asociado con las manos de trabajadores del área de salud, y es particularmente frecuente en infecciones sistémicas en neonatos prematuros de bajo peso, pacientes cateterizados, además de pacientes bajo esquemas de hiperalimentación intravenosa (Trofa *et al.*, 2008).

Su amplio patrón de distribución en la naturaleza, su creciente incidencia en varias partes del mundo, su relativamente alta frecuencia de resistencia a las equinocandinas, además de la escasa información con la que se cuenta hasta el momento dejan en claro que *C. parapsilosis* es un importante patógeno oportunista, representando una amenaza desafiante. (Rogelio *et al.*, 2012).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Los extractos hexánico, diclorometánico, etanólico y acuoso de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”, tienen actividad antimicrobiana *in vitro* frente a patógenos aislados de hemocultivos.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos hexánico, diclorometánico, etanólico y acuoso de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a patógenos bacterianos y fúngicos de origen hospitalario.

3.2.2 Objetivos Específicos

1. Obtener extractos orgánicos con hexano, diclorometano, etanol y agua a partir de macerados de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”.
2. Realizar el análisis fitoquímico preliminar de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos frente a patógenos bacterianos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) y fúngicos (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilopsis*) aislados de hemocultivos y cepas controles ATCC (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* 750).
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto orgánico que presente mayor actividad antimicrobiana.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Colecta e identificación del material vegetal de estudio:

Las Hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” fueron recolectadas de plantaciones procedentes del distrito de Huaccana (latitud 12° 2' 26.6719" S, longitud 76° 58' 1.2882" W), de la provincia de Andahuaylas, departamento de Apurímac ubicada a 3 078 m de altitud. Las muestras fueron identificadas en el laboratorio de Taxonomía Vegetal Departamento Académico de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

4.1.2 Microorganismos

- Cepas patógenas de origen hospitalario, aisladas de hemocultivos procedentes de distintos servicios e identificadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen ubicado en la provincia de Lima, Perú (Tabla 1).
- Cepas de referencia como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Tabla 1. Microorganismos utilizados en el estudio de la actividad antimicrobiana de *Luma chequen*

No de muestra (código)	Identificación del paciente	Servicio	Patógeno aislado
19031331	4510031LERIL005	Emergencia	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
14031325	420404POGC	Nefrología	<i>Staphylococcus aureus</i>
11021315	1301300GMAT	Neonatología	<i>Escherichia coli</i>
14041308	1403115MAVC	Unidad de cuidados intensivos (UCI)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
17091232	2906010LTAO	Cardiología	<i>Candida parapsilopsis</i>
13091226	5203140MSPO	Nefrología	<i>Candida tropicalis</i>
24091223	470727LNTE	Unidad de cuidados intensivos (UCI)	<i>Candida albicans</i>

4.2 Metodología

4. 2.1. Preparación del pulverizado vegetal

Las hojas recolectadas fueron seleccionadas y limpiadas adecuadamente, luego se pesaron y se desecaron bajo sombra por 3 días; se llevó a secar nuevamente en una estufa a temperatura 40°C por 48 horas hasta obtener una muestra totalmente seca y fácilmente triturable al frotar con la mano. Posteriormente las hojas se volvieron a pesar, se pulverizó haciendo uso de un molinillo manual de acero inoxidable hasta obtener la muestra molida con aspecto pulverulento similar a un liofilizado estándar. El pulverizado se guardó en frascos oscuros, etiquetados con los siguientes datos: nombre común, nombre científico, fechas de recolección y almacenamiento de la muestra. Se conservó en un lugar fresco y seco hasta su utilización posterior.

4.2.2. Obtención del extracto

Este proceso se realizó siguiendo las recomendaciones de León *et al.*, (2010); Gómez, 2010. Se realizaron extracciones sucesivas empleando 200g de material vegetal pulverizado y solventes de baja (hexano), mediana (diclorometano) y alta (etanol) polaridad; obteniendo así tres extractos, los cuales fueron sometidos a rota-evaporación para recuperar el solvente y obtener el extracto limpio, este último fue secado en estufa a 40°C.

4.2.2.1. Extracción con hexano (baja polaridad)

El vegetal pulverizado (200 gr) se colocó en un frasco oscuro color caramelo con 500 ml del solvente hexano, sellado herméticamente para evitar evaporación del solvente

durante la extracción. Se dejó reposar por 7 días a temperatura ambiente, se agitó con frecuencia unas tres veces por día aproximadamente. Una vez transcurrido el tiempo de la extracción el solvente se separó del resto de la muestra mediante filtración en papel Whatman N° 1 (Whatman International LTD. England), obteniéndose de esta manera el extracto libre de residuos, el filtrado fue llevado a rota-evaporación con una temperatura de 40°C y presión de 110 milibares para recuperar solvente y obtener el extracto limpio, este último fue secado en estufa a 40°C. El extracto con hexano fue conservado en frascos oscuros en refrigeración a 4°C hasta su uso (Anexo 3 A).

4.2.2.2. Extracción con diclorometano (mediana polaridad)

El residuo semisólido obtenido en la extracción con hexano fue colocado en un frasco oscuro color caramelo para la extracción con diclorometano y se repitió el proceso anteriormente descrito (Anexo 3 A).

4.2.2.3 Extracción con etanol (alta polaridad)

El residuo semisólido (marco) obtenido en la extracción con diclorometano fue colocado en un frasco oscuro color caramelo para la extracción con etanol y se repitió el proceso anteriormente descrito (Anexo 3 A).

4.2.2.4 Extracción acuosa

Sobre 20 gr del material vegetal pulverizado se agregó 100 ml de agua destilada entre 70°C a 75 °C durante 5 min, se dejó reposar y luego se filtró con papel Whatman N° 1 (Whatman International LTD. England), obteniéndose de esta manera el filtrado libre de

residuos y fue secado en estufa a 40°C El extracto fue conservado en frascos oscuros en refrigeración a 4°C hasta su uso (Anexo 3 B).

4.2.3 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico preliminar fue realizado siguiendo la metodología de Lock (1988). Se llevó a cabo a partir del extracto acuoso del material vegetal en estudio, con la finalidad de detectar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, fenoles, alcaloides, cumarinas, antocianinas, triterpenos y/o esteroides, saponinas, quinonas y antraquinonas, leucoanticianidina.

Alcaloides:

Se procedió a la extracción de alcaloides en dos viales de 20 ml.

1. En un vial se colocó 3 g del material vegetal pulverizado en solución etanólica ácida de HCl 1N (10 ml EtOH+1 ml HCl) durante 30min.
2. En un segundo vial se colocó 3g del material vegetal pulverizado en solución acuosa ácida de HCl 1N (10 ml H₂O+1 ml HCl) durante 30min.

Después de 30 min luego que la solución torna un color pardo rojizo oscuro en ambos viales, se filtró y se añadieron los siguientes reactivos de identificación.

Reactivo de Dragendorff: Se agregó unas cuantas gotas de este reactivo a la solución acida del alcaloide se observó la aparición de un precipitado naranja rojizo (indicio de la presencia de alcaloides).

Reactivo de Mayer: Al agregar un exceso de reactivo a la solución acidulada del alcaloide se observó la aparición de un precipitado de blanco a crema.

Reactivo de Wagner: Se partió de la solución ácida, de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución, se adicionó 2 ó 3 gotas del reactivo de Wagner y se observó la aparición de un precipitado color marrón.

Saponinas:

Estabilidad de espuma.- Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica.

En un tubo de ensayo se colocó 3 mL de extracto acuoso, se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se dejó reposar por 1 minuto. La prueba se considera positiva si la espuma es persistente por más de 10 minutos y alcanza una altura de más de 2 mm.

Esteroides y/o Triterpenos:

Ensayo de Liebermann-Burchard

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, en ambos tipos de productos debe poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello se preparó un extracto acuoso y se tomó 10 mL, se realizó 2 extracciones con cloroformo en una pera de decantación, luego el extracto clorofórmico se lavó con agua destilada y se dejó secar con anhídrido Na_2SO_4 , posteriormente se filtró y se concentró a 3 mL (baño maría).

Una vez obtenido el extracto concentrado se agregó 1 mL de anhídrido acético refrigerado, más dos gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes sin agitar.

La formación de una coloración azul a verde, indica la presencia de saponinas esteroidales; si la coloración fuese rosa, roja, magenta o violeta indica la presencia de saponinas triterpenoides.

La reacción de Liebermann-Burchard es también utilizada para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantófilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

Quinonas y antraquinonas:

Ensayo de Borntrager

Del extracto acuoso se tomaron 20 ml y se realizaron 2 extracciones con benceno en una pera de decantación, luego el extracto bencénico se lavó con agua destilada y se dejó secar con anhidro Na_2SO_4 , posteriormente se filtró y se concentró a 3 mL (baño maría).

Luego al extracto bencénico concentrado se agregó 1mL de NaOH al 5%. Se agitó vigorosamente mezclando las fases, y se dejó en reposo hasta su ulterior separación.

Si la fase del benceno se decolora y la fase acuosa alcalina se colorea de rosa-rojo indica la presencia de quinonas.

Leucoanticianidina: A 3 mL de extracto acuoso se le añadió 1 mL de HCl 2N (en 1-propanol), sin agitar ni mezclar por las paredes del tubo, luego se calentó a 45°C durante 15-30 segundos; si la parte alcohólica se colorea de rojo carmesí indica la presencia de leucoanticianidina.

Cumarina volátil: Se colocó 3 mL del extracto acuoso en un tubo de ensayo y se calentó a baño maría, se hizo hervir durante 10-15 segundos (vapores), luego se colocó en un papel filtro rectangular con 2 gotas de NaOH 10% en la boca del tubo de ensayo hasta que los vapores humedezcan el papel.

Se retiró el papel y la observación de fluorescencia verde amarillenta bajo la lámpara de UV a 365nm indica la presencia de cumarinas volátil, la fluorescencia dura 24 horas.

Cumarina fija: En un papel filtro rectangular se colocó 2 gotas del extracto acuoso y se adicionó 2 gotas de NaOH 10%, se comparó la fluorescencia haciendo uso de una lámpara de UV a 365 nm.

Cuando hay cumarina fija no hay cumarina volátil.

Flavonoides:

Con Reactivo de Shinoda: En un tubo de ensayo se colocó 1mL de muestra con 2 limaduras de magnesio, se añadió 3 gotas de HCl concentrado. Si después de 10 minutos la solución toma un color naranja intenso, entonces la prueba es positiva para flavonoides.

Con Reactivo de NaOH: En una placa de toque se colocó 5 mL de extracto acuoso y se agregó unas gotas de NaOH 10%. La aparición de colores que van del amarillo al rojo se considera indicativa de la presencia de flavonoides.

Luego para comprobar se colocó 2 gotas de extracto acuoso en un papel filtro se dejó secar y se llevó a vapores de amoníaco si se intensifica el color amarillo entonces la prueba se considera positiva para flavonoides.

Taninos:

Reacción con Cloruro férrico:

En una placa de toque se colocó 1ml de la muestra y se añadió 2ml de FeCl_3 . Si la prueba es positiva instantáneamente la solución toma un color verde oscuro casi negro, lo que indica la presencia de compuestos fenólicos y taninos.

Precipitación con Agua de Bromo: En una placa de toque se colocó 1ml de la muestra y se agregó 1ml de agua de bromo. La precipitación con el agua de bromo indica la presencia de un tanino catéquico o flobatanino.

4.2.4 Obtención, reactivación y verificación de las cepas clínicas

Las cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* fueron obtenidas del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. El aislamiento primario se realizó a partir de frascos de hemocultivo se sembró en Agar Sangre y las colonias presuntivas se purificaron en Agar Tripticasa Soya (TSA) y fueron incubadas a 37°C por 24 a 48 h; una vez aisladas las colonias presuntivas se hicieron las pruebas bioquímicas para su identificación según Koneman (2008). Las formas levaduriformes fueron repicadas en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA), para verificar la pureza de las cepas fúngicas se realizó pruebas complementarias según INS (2007), tubo germinativo, Clamidospora, medio cromogenico, agar Mycosel y pruebas bioquímicas para diferentes azúcares como se puede observar en la Tabla 6 (Ver Anexo 1).

Se tomó en consideración su resistencia a los antimicrobianos convencionalmente usados (Ver Anexo 2 A, B, C).

La sensibilidad de las levaduras fueron determinadas mediante el Sistema Automatizado VITEK® 2 Compact; y en cambio la sensibilidad de los patógenos bacterianos fueron determinados mediante el Sistema Automatizado Micro Scan Walk Away según las instrucciones del proveedor de estos equipos.

Las cepas fúngicas fueron conservadas en viales con Agar Sabouraud a 4°C; y las cepas bacterianas se conservaron por el método del glicerol a -20°C en eppendorf de 1 mL conteniendo 500 µL de glicerol y 500 µL de TSA. A partir de estos eppendorf las cepas bacterianas fueron reactivadas y sembradas en TSA para obtener microorganismos viables y poder trabajar con ellos.

Para las cepas de referencia como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750 se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para cepas fúngicas como para las bacterianas.

4.2.5 Preparación y estandarización del inóculo.

Inicialmente se verificó la viabilidad de cada uno de los microorganismos a ensayar, para la preparación del inóculo se partió de un cultivo de 18 a 24 h en Agar Sabouraud Dextrosa a 35(± 2° C) para levaduras y en TSA para bacterias a 37°C.

A partir de estos cultivos en crecimiento activo, se tocan tres a cinco colonias y se resuspendieron en 5 mL de solución salina estéril (NaCl 0,85%). El resultado de la suspensión se homogenizó durante 15 segundos y su turbidez se ajustó a 0,5 de la escala Mc Farland que permite a simple vista (Figura 13) conocer la cantidad aproximada de células bacterianas y de levaduras presentes en la dilución (CLSI, 2013).

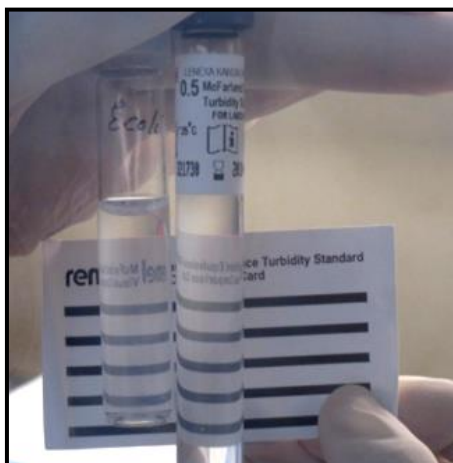


Figura 3: Comprobación visual de la escala 0.5 de Mc Farland

4.2.6 Determinación de la sensibilidad de cepas patógenas a los extractos orgánicos de hexano, diclorometano, etanol y agua de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” mediante el Método Modificado de Difusión en Pocillos (MDP).

Este proceso se realizó siguiendo la metodología de Huamani & Ruíz. (2005) con algunas modificaciones. Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos de hexano, diclorometano, etanol y agua de la especie vegetal *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* aisladas de hemocultivos y cepas referenciales de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, se aplicó un diseño experimental, en el cual se evaluó la capacidad de los extractos orgánicos capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos seleccionados a través de la prueba de sensibilidad antimicrobiana.

4.2.6.1 Preparación de la concentración de extracto

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos orgánicos obtenidos, se tomó un eppendorf estéril y en una balanza analítica, con una espátula cucharilla de metal estéril se pesó una cantidad de extracto seco y se diluyó en dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% hasta obtener una concentración de 100 mg/mL, esto se disolvió con ayuda de un agitador vortex. Los diferentes extractos orgánicos obtenidos fueron esterilizados por filtración en membranas (Millipore 0,22 μ m) (Rodríguez *et al.*, 2010).

4.2.6.2 Preparación de las placas

Para evaluar la sensibilidad de las cepas de microorganismos patógenos se utilizó el método modificado de difusión en pozos para lo cual se prepararon placas Petri con Agar Mueller Hinton a 45°C para bacterias y Agar Mueller Hinton suplementado al 2% de glucosa para levaduras. Posteriormente se agregó 1 mL de suspensión de inóculo de cada microorganismo patógeno por cada 25 mL de medio de cultivo, se mezcló asépticamente luego se repartió en placas petri y se dejó solidificar.

4.2.6.3 Inoculación e incubación de las muestras

Posteriormente se hizo pocillos con la ayuda de un sacabocado (tapón horador) de 6 mm de diámetro, sobre los pozos se depositaron 50 μ L de los extracto orgánicos de hexano, diclorometano, etanol y agua preparados a una concentración de 100 mg/mL (carga final por pocillo 5 mg).

Se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 37°C por 24 h. Luego se realizó la lectura, registrando el diámetro de los halos de

inhibición. Las pruebas se realizaron por triplicado teniendo en cuenta un control positivo para levaduras Fluconazol (0,2 mg/mL), bacterias Gentamicina (80 mg/mL) y control negativo (Dimetilsulfóxido al 5%).

4.2.6.4 Lectura e interpretación de resultados

Luego de transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura correspondiente con la observación de los halos de inhibición, se midieron los diámetros en mm de cada halo de inhibición en tres direcciones, empleando un vernier (Figura 4).

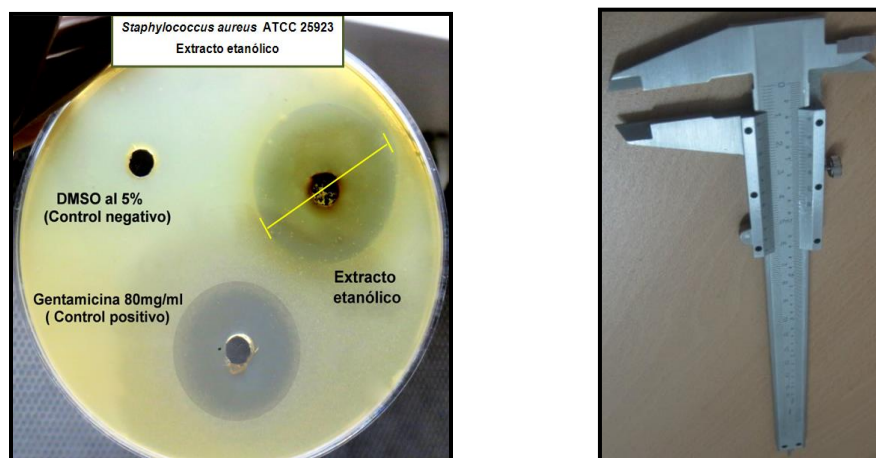


Figura 4. Medición de diámetros de halos de inhibición de la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos.

Los valores obtenidos se promediaron hallándose el diámetro medio que fue utilizado como índice de actividad antimicrobiana, la presencia o ausencia de una zona de inhibición fue usada como criterio para seleccionar el mejor extracto que inhibió a la mayoría de microorganismos patógenos, para luego realizar la prueba de micro dilución en placa de 96 pocillos y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Se comparó el diámetro de la zona inhibida por el extracto con el diámetro del antimicrobiano comercial usado como control positivo de la inhibición CLSI (2013) y CLSI (2004). Los pasos descritos con anterioridad se ven resumidos en el Anexo 4.

4.2.7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La prueba de CMI se realizó siguiendo la metodología según León *et al.* (2010). Se determinó mediante un ensayo de microdilución en Caldo Tripticasa Soya (TSB) utilizando el extracto etanólico, debido a que fue el extracto orgánico que presentó mayor actividad antimicrobiana.

Las cepas patógena empleadas para esta prueba fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* aisladas de hemocultivos y cepas referenciales de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750.

4.2.7.1 Preparación de las concentraciones:

Se realizaron pruebas de microdilución considerándose que los extractos no son compuestos puros, sino productos naturales que presenta una mezcla de compuesto por lo que se requiere el empleo de concentraciones mayores.

Se tomó un eppendorf estéril y en una balanza analítica, con una espátula cucharilla de metal estéril se pesó una cantidad de extracto etanólico seco y se resuspendió en DMSO (Merck) al 5% para obtener una solución stock de 50 mg/mL, esto se disolvió con ayuda de un agitador vortex. A partir de esta solución, se realizaron diluciones 1:2, obteniendo concentraciones desde 50 mg/mL hasta 0,39 mg/mL.

4.2.7.2 Inoculación e incubación de las muestras

En placas de 96 pocillos se colocaron en cada uno 80 μ L de Caldo Tripticasa Soya. Luego se agregó 10 μ L de la solución del extracto etanólico usando 8 concentraciones diferentes. Posteriormente se añadió 10 μ L del inóculo de cada uno de los patógenos a cada pocillo y las microplacas se incubaron durante 18- 24 horas a 37 °C.

En todos los ensayos se colocaron controles de esterilidad de medio, control del solvente, control de crecimiento y controles positivos. El control negativo fue el medio solo con DMSO al 5% sin añadidura del extracto, como control positivo de la actividad antifúngica, se utilizó el Fluconazol (0,2 mg/mL) y para el bioensayo de la actividad antibacteriana se utilizó Gentamicina (80 mg/mL). Las pruebas se realizaron por triplicado.

Una vez cumplido el tiempo de incubación se adicionó 40 μ L de 2, 3,5 –Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC; 5 mg/mL) en cada uno de los pocillos, y se colocó nuevamente en incubación por 20 minutos. La lectura se realizó de manera visual colorimétrica, verificando en primer lugar que los resultados obtenidos con los controles fueran los esperados; esto es, que el control negativo estuviera completamente transparente y en el control positivo hubiera suficiente crecimiento. El viraje del color del medio a rojo intenso fue considerado como indicativo de crecimiento microbiano y sin crecimiento si el medio permaneció claro. Los pasos descritos con anterioridad se ven resumidos en el Anexo 5.

4.2.8 Análisis e interpretación de resultados

Con el fin de evaluar el efecto individual y conjunto de los factores (variables independientes categóricas) que presentó el estudio sobre la variable dependiente cuantitativa (diámetro del halo de inhibición en mm) se utilizó el modelo factorial de Análisis de Varianza (ANOVA).

Posteriormente para identificar diferencias estadísticas significativas entre los factores establecidos se utilizó la prueba de Tukey al 95% de confianza, la cual es un tipo particular de prueba que pertenece a las comparaciones múltiples post hoc o comparaciones a posteriori, con lo cual se determinó qué media aritmética específicamente difiere de las otras medias aritméticas obtenidas, cuando se ha rechazado la hipótesis general. Estos datos se analizaron mediante el programa estadístico para Windows SPSS versión 20.0 (2012).

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de extractos: La preparación de los extractos orgánicos de hexano diclorometano, etanol fueron de fácil procedimiento, sin presentar ningún inconveniente al momento de obtenerlos. La Tabla 2 revela que la extracción con etanol produce mayor cantidad de extracto seco, por lo que se le considera como el solvente que presenta mayor rendimiento.

Tabla 2. Descripción de extractos orgánicos de *Luma chequen*

Tipos de extractos orgánicos	Filtrado recuperado (mL)	Extracto recuperado (mL)	Extracto seco (g)	Color del extracto
Hexánico	160	18	2,15	verde esmeralda
Diclorometánico	110	15	3,11	verde oscuro
Etanólico	180	25	4,23	verde oscuro
Acuoso	100	60	3,03	castaño

5.2 Tamizaje fitoquímico preliminar

Una de las etapas más representativas en el estudio preliminar de una especie vegetal es la determinación cualitativa de grupos químicos que ayudan a comprender su fisiología y bioquímica, logrando su mejor aprovechamiento con fines científicos y medicinales. En el análisis fitoquímico preliminar realizado al extracto acuoso de las hojas *Luma Chequen*, para la determinación parcial de los grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes, se encontró la presencia de alcaloides, compuestos fenolicos, tanino y flavonoides. Los resultados de las pruebas realizadas se muestran en la Tabla 3 y Anexo 6.

Tabla 3. Pruebas fitoquímicas de identificación de metabolitos secundarios por pruebas de coloración y precipitación encontrados en el extracto acuoso de “arrayán”.

Constituyentes Químicos	Método de ensayo	Reacción
	Reactivo de ensayo	
Alcaloides	Dragendorff	+++
	Mayer	+++
	Wagner	++
Flavonoides	Hidróxido de sodio	+++
	Shinoda	+++
Taninos	Agua de bromo	+++
	Reacción con FeCl ₃	+++
Fenoles	FeCl ₃ 5 %	+++
Cumarinas	Hidróxido de sodio 10 %	(-)
Antocianinas	Hidróxido de sodio	(-)
Triterpenos y/o esteroides	Reacción de Liebermann Burchard	(+)
Saponinas	Prueba de la espuma	(-)
Quinonas y antraquinonas	Ensayo de Borntrager	(-)
Leucoanticianidina	Ensayo de Rosenheim	(+)

Interpretación

(-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia

El tamizaje fitoquímico preliminar fue realizado siguiendo la metodología de Lock (1988), la presencia de metabolitos secundarios encontrados en el extracto acuoso de “arrayán”, se determinó mediante pruebas cualitativas de coloración y precipitación.

Al realizar las pruebas preliminares se pudo observar la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, fenoles, triterpenos y/o esteroides y leucoanticianidina.

En el caso de flavonoides, se obtuvo una coloración amarilla, con la prueba hidróxido de sodio luego de exponer a vapores de amonio el color amarillo se intensificó.

En la prueba de taninos donde se utilizó sales férricas, se obtuvo un precipitado verde oscuro, lo que representó la presencia de taninos flavónicos.

Se detectó la presencia de alcaloides mediante el reactivo Dragendorff evidenciándose la aparición de un precipitado que va de naranja a rojo.

En el caso de reactivo Mayer se observó la presencia de un precipitado, y en el reactivo Wagner un precipitado de color marrón Wagner, aunque en la bibliografía se menciona la ausencia de alcaloides.

5.3 Obtención, reactivación y verificación de las cepas hospitalarias.

La Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 6 muestra los resultados de identificación y caracterización de los patógenos utilizados en el presente estudio.

Tabla 4. Identificación y caracterización de Enterobacterias

	<i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia Coli</i>
Crecimiento	Agar Mc Conkey	Agar Mc Conkey	Agar Mc Conkey
Oxidasa	Negativo	Negativo	Negativo
Aspecto en Placa	Colonias convexas, bordes redondeados.	Colonias grandes, mucoides, brillantes	Colonias circulares, convexas, bordes redondeados.
Gram	Gram negativos	Gram negativos	Gram negativos
Morfología microscópica	Bacilos rectos	Bacilos cortos, pequeños bastoncillos	Bacilos rectos, pequeños bastoncillo
Lactosa	Positivo	Positivo	Positivo
Citrato	Negativo	Positivo	Negativo
TSI	negativo	Negativo	Negativo
LIA	Negativo	Positivo	Negativo
Motilidad	positivo	Negativo	Positivo
Indol	Positivo	Negativo	Positivo
Rojo De Metilo	Positivo	Negativo	Positivo
Prueba Voges Proskauer	Negativo	Positivo	Negativo
Ureasa	Negativo	Positivo	Negativo

Tabla 5. Identificación y caracterización del género *Staphylococcus*

	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Crecimiento	Agar sangre	Agar sangre	Agar sangre
Aspecto en Placa	Colonias grandes	Colonias blancas pequeñas	Colonias grandes
Pigmentación de Colonias	Amarillas doradas	Blancas puntiformes, de forma circular, superficie lisa	Amarillas doradas
Fermentación manitol	Positivo	Negativo	Positivo
Coloración Gram	Gram positivo	Gram positivo	Gram positivo
Morfología microscópica	Masas arracimadas y redondas	Masas arracimadas irregulares	Masas arracimadas y redondas
Catalasa	Positiva	Positiva	Positiva
Susceptibilidad a la Novobiocina	Sensible	Sensible	Sensible
Coagulasa	Positivo	Negativo	Positivo

Tabla 6. Identificación y caracterización de levaduras del género *Candida*

Cepas de levaduras	TG (2 h y 30 min a 37°C)	CL 24 h a T° amb	Chrom 24-48 h a 37°C	Urea 24 h a 37°C	Myc 3 días a T° amb	Velo 3 días a T° amb	Características bioquímicas (48 h a 37 °C)					
							GLU	LAC	SAC	MAL	GAL	RAF
<i>Candida albicans</i> 90028	+	+	verdes	+	++	+	+	-	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i> 750	-	+	azules	-	-	++	+	-	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i>	-	+	verde	+	++	+	+	-	+	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	+	azules	-	-	++	+	-	+	+	+	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	cremas	-	-	-	+	-	+	+	+	-

TG: tubo germinativo, CL: Clamidospora; CHROM: medio cromogénico; Myc: agar Mycosel; GLU: glucosa; LAC: lactosa; SAC: sacarosa; MAL: maltosa; GAL: galactosa; RAF: rafinosa.

5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para discernir si los extractos evaluados presentaron o no actividad y si esta es válida, se tomó como referencia el halo de inhibición de los controles positivos empleados, descritos por el CLSI (2013) (Tabla 7) para bacterias (Gentamicina) y CLSI (2004) (Tabla 8) para levaduras (Fluconazol). En el caso de los controles positivos, todas las cepas fueron sensibles al antibiótico (Tabla 9 y 10). En lo que respecta al control negativo, los halos de inhibición fueron de 0 mm para todos los microorganismos.

En cuanto a los controles positivos se usó la Gentamicina como control positivo bacteriano teniendo en cuenta que es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro y actúa inhibiendo la síntesis proteica de Gram positivos y Gram negativos (Pediamécum, 2012); y el Fluconazol como control positivo fúngico ya que posee actividad frente a la mayoría de las especies del género *Candida* y se caracteriza por presentar una excelente biodisponibilidad y a baja toxicidad, además de presentar una muy buena penetración a tejidos y fluidos (Murray *et al.*, 2007).

Tabla 7. Normas de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión M100-S23 (CLSI, 2013).

Antimicrobiano	Enterobacterias y <i>Staphylococcus spp</i> (mm de diámetro de halos de inhibición)		
Gentamicina	Sensible	Intermedio	Resistente
	≥ 15	13- 14	<12

Tabla 8. Método de referencia para las pruebas de sensibilidad antifúngica de levaduras por el método de disco difusión M44-A (CLSI, 2004).

Antifúngico	Levaduras (mm de diámetro de halos de inhibición)		
	Sensible (S)	Sensible dosis dependiente (SDD)	Resistente (R)
Fluconazol	≥ 19	15-18	≤14

Tabla 9. Susceptibilidad de los microorganismos de origen hospitalario frente a un antibiótico de referencia.

Microorganismos de origen hospitalario	Antimicrobiano	Diámetro del halo (mm) (\bar{x})
<i>Escherichia coli</i>	Gentamicina	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gentamicina	27
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gentamicina	22
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gentamicina	25
<i>Candida albicans</i>	Fluconazol	23
<i>Candida tropicalis</i>	Fluconazol	23
<i>Candida parapsilosis</i>	Fluconazol	24

Concentraciones: Gentamicina (80 mg/mL); Fluconazol (0,2 mg/mL).

Tabla 10. Susceptibilidad de los microorganismos de origen referencial frente a un antibiótico de referencia.

Microorganismos de origen referencial	Antimicrobiano	Diámetro del halo (mm)(\bar{x})
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Gentamicina	23
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gentamicina	26
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	Fluconazol	23
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	Fluconazol	23

Concentraciones: Gentamicina (80 mg/mL); Fluconazol (0,2 mg/mL).

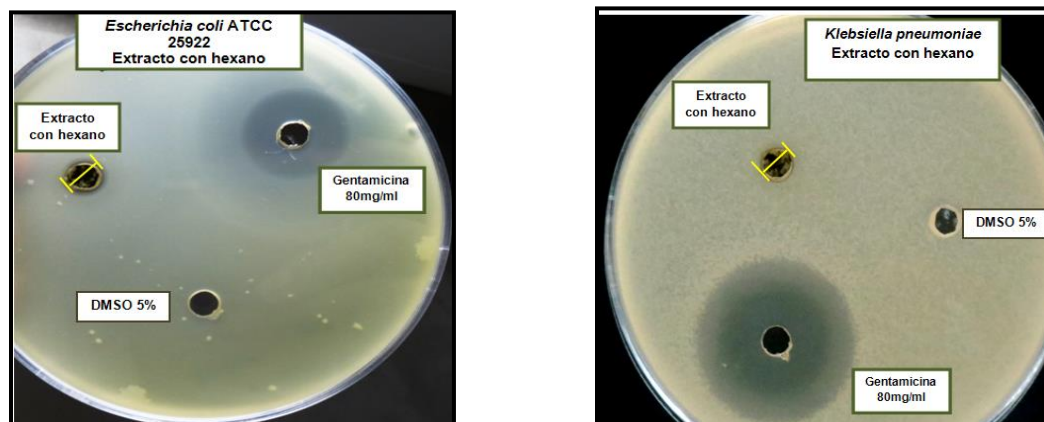
Tabla 11. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos orgánicos de *Luma chequen* frente a bacterias patógenas.

Microorganismos bacterianos	Diámetro de la zona de inhibición (mm) (\bar{x})			
	Extracto hexánico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto acuoso
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	9	25	14
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10	25	29	14
<i>Escherichia coli</i>	7	7	26	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	10	24	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	11	25	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	8	25	12

Tabla 12. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos orgánicos de *Luma chequen* frente a las levaduras.

Microorganismos del género <i>Candida</i>	Diámetro de la zona de inhibición (mm) (\bar{x})			
	Extracto hexánico	Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto acuoso
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	6	6	20	6
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 00750	6	6	19	6
<i>Candida albicans</i>	6	6	19	7
<i>Candida tropicalis</i>	7	7	18	6
<i>Candida parapsilosis</i>	11	8	19	9

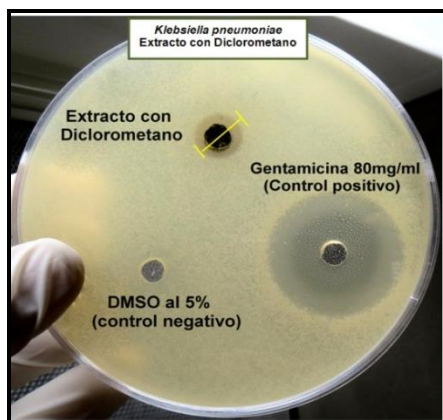
En cuanto a la sensibilidad de los patógenos bacterianos, el extracto hexánico presento una mínima inhibición como se observa en la Figura 5 y Tabla 11.



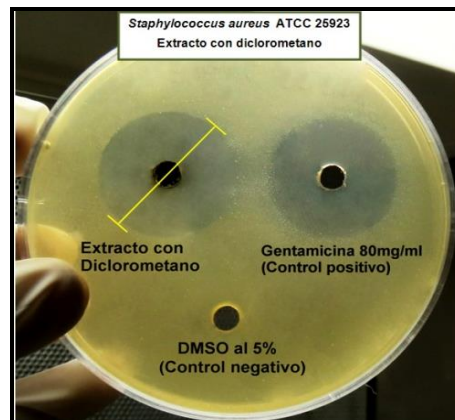
A. Extracto hexánico frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 **B.** Extracto hexánico frente a *Klebsiella pneumoniae*

Figura 5. Actividad antimicrobiana del extracto hexánico

El extracto diclorometánico solamente mostró una alta inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (25 mm) a diferencia del resto de patógenos bacterianos como se observa en la Figura 6.



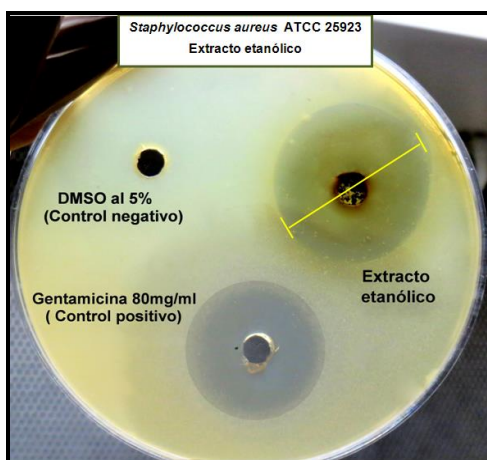
A. Extracto diclorometánico frente a *Klebsiella pneumoniae*



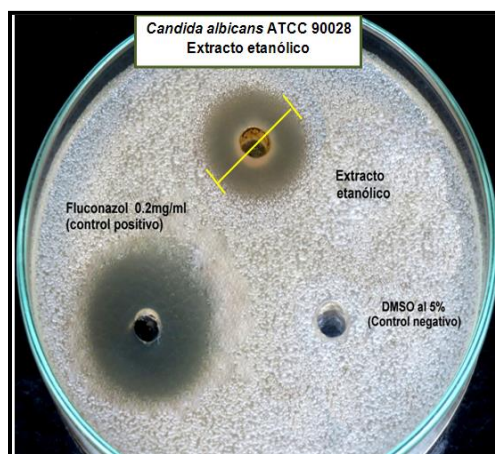
B. Extracto diclorometánico frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Figura 6. Actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico

En cuanto al extracto etanólico presentó la mayor actividad inhibitoria frente a todos los patógenos bacterianos como se muestran en la Figura 7 y Tabla 11, y en lo que concierne a las levaduras del género *Candida* solo el extracto etanólico tuvo actividad sobre estos patógenos, con similar media del diámetro de halo de inhibición como se muestra se observa en la Tabla 12.



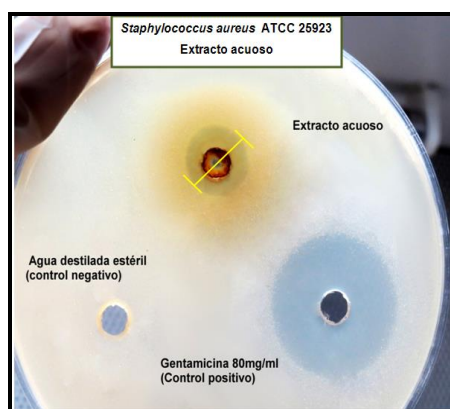
A. Extracto etanólico frente a *Staphylococcus aureus* ATCC25923



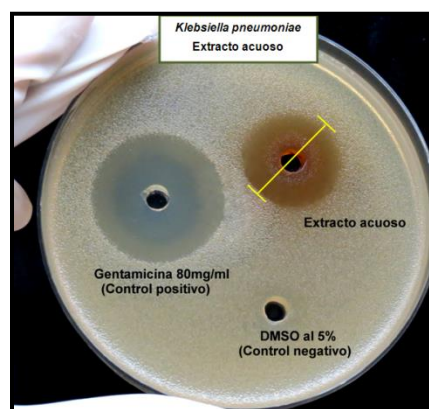
B. Extracto etanólico frente a *Candida albicans* ATCC 90028

Figura 7. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico

El extracto acuoso no mostró efecto antifúngico alguno (Tabla 12), sin embargo sobre patógenos bacterianos como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 presentó una mediana actividad inhibitoria como se muestra en la (Tabla 11 y Figura 8).



A. Extracto acuoso frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



B. Extracto acuoso frente a *Klebsiella pneumoniae*

Figura 8. Actividad antimicrobiana del extracto acuoso

5.4.1 Análisis de datos para cepas patógenas bacterianas

La Tabla 13 está conformada por: las fuentes de variabilidad (FV), la suma de cuadrados (SC), los grados de libertad (gl), los cuadrados medios (CM), el estadístico de prueba (F) y la significancia observada (p) asociados a cada estadístico F.

Tabla 13. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para patógenos bacterianos.

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados (SC)	gl	Media cuadrática(CM)	F	Sig.(p)
Tipos extractos	2010,800	4	502,700	40,606	,000
Cepas bacterianas	309,500	25	12,380		
Total	2320,300	29			

La Tabla 13 nos muestran que los grupos definidos por tipo microorganismo, en este caso cepas patógenas bacterianas y tipo de extracto orgánico, poseen diferencia significativa de la actividad inhibitoria, el estadístico F, lleva asociado un valor $p < 0,05$, lo cual indica que las interacciones entre los factores poseen un efecto significativo sobre el diámetro del halo de inhibición.

Considerando la diferencia significativa que mostraron los factores evaluados: Microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*; Extracto de *Luma chequen* (Molina) A. Gray (arrayán) en hexano, diclorometano, etanol, agua y Gentamicina como control positivo; se realizó pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey, cuyos resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 14. Subconjuntos homogéneos - DHS de Tukey generales (Solventes de extracción frente a bacterias patógenas).

	Tipo de extracto	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
			1	2
HSD de Tukey ^a	Hexánico	6	8,00	
	Diclorometánico	6	11,67	
	Acuoso	6	12,67	
	Etanólico	6		25,67
	Gentamicina - Control positivo	6		28,50
	Sig.		,179	,637
Tukey B ^a	Hexánico	6	8,00	
	Diclorometánico	6	11,67	
	Acuoso	6	12,67	
	Etanólico	6		25,67
	Gentamicina – Control positivo	6		28,50

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

En la comparación de medias de los extractos orgánicos de *Luma chequen* “arrayán”, la Tabla 14, demuestra que los extractos con hexano, presenta la actividad inhibitoria más baja con respecto a sus medias (8 mm), seguida de los extractos con diclorometano (11,67 mm) y agua (12,67mm), el extracto etanólico presentó el mayor valor (25,67mm) en la media del diámetro del halo de inhibición en el crecimiento de las cepas patógenas bacterianas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis*) los cuales nos indican que es el extracto más representativo porque presenta mayor actividad inhibitoria con respecto a los extractos del subgrupo 1 y difiere significativamente de estos.

Tabla 15. Intervalos generales de confianza al 95% (Solvente de extracción usado frente a bacterias patógenas).

Tipo de extracto	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Hexánico	6	8,00	1,549	,632	6,37	9,63	6	10
Diclorometánico	6	11,67	6,683	2,728	4,65	18,68	7	25
Etanólico	6	25,67	1,751	,715	23,83	27,50	24	29
Acuoso	6	12,67	2,733	1,116	9,80	15,53	8	16
Gentamicina - Control positivo	6	28,50	2,074	,847	26,32	30,68	25	31
Total	30	17,30	8,945	1,633	13,96	20,64	6	31

La Tabla 15 presenta los resultados obtenidos al analizar el efecto de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de cepas bacterianas patógenas, haciendo énfasis en el extracto etanólico que presentó el mayor valor de la media del diámetro del halo de inhibición de 25,67 mm con límites entre $23,83 \leq \mu \leq 27,5$ mm y el control positivo Gentamicina (28,50mm) con límites entre $26,32 \leq \mu \leq 30,68$ mm. Para todos los extractos evaluados el intervalo de confianza al 95 % presenta límites entre los cuales los datos de los halos de inhibición se traslapan entre sí, es decir que comparten valores de diámetro de halos de inhibición.

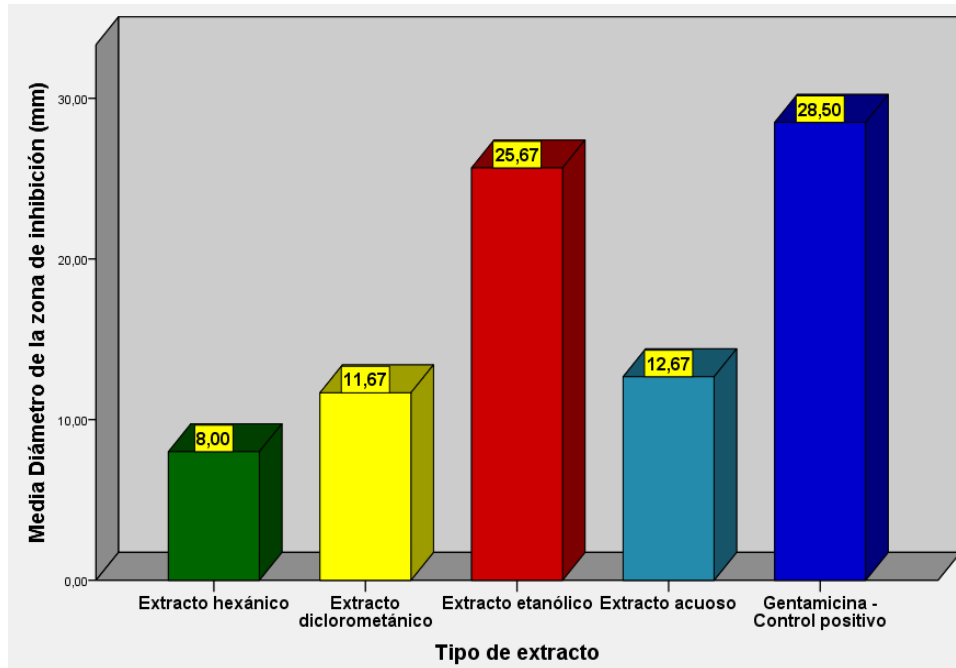


Figura 9. Media del diámetro del halo de inhibición, según el tipo de extracto y el control positivo frente a bacterias patógenas.

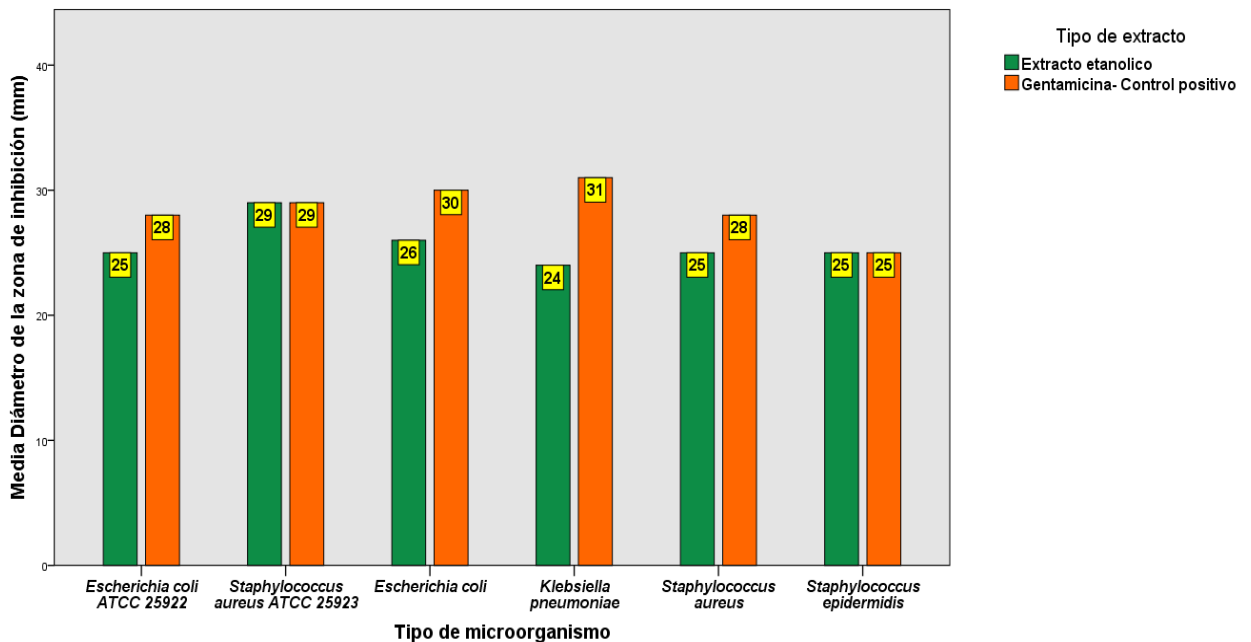


Figura 10. Media del diámetro del halo de inhibición del extracto etanólico comparado con el control positivo frente a bacterias patógenas.

La Tabla 14 nos indica que el control positivo para patógenos bacterianos (Gentamicina) presentó una media de halo altamente significativa, en comparación a los halos observados con los extractos evaluados, además se demostró que el extracto etanólico fue el que evidenció mayor actividad inhibitoria frente a los 6 patógenos bacterianos evaluados en éste estudio (Figura 11), representando en promedio un 90,2% del halo obtenido por Gentamicina (Figura 10).

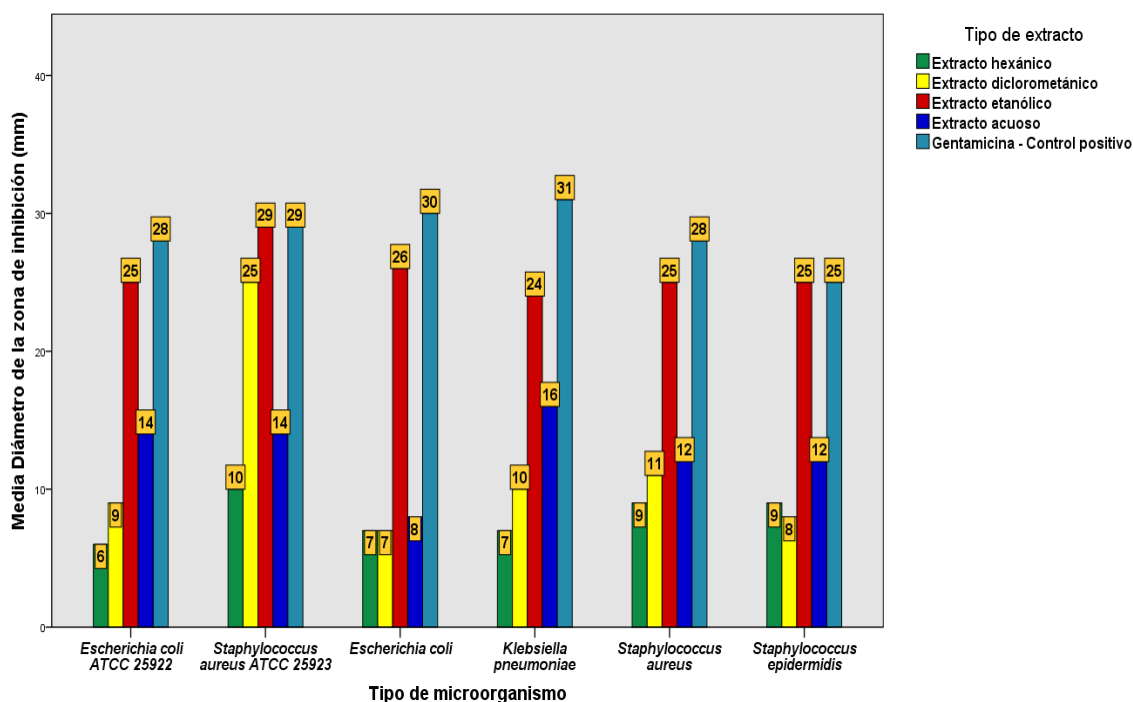


Figura 11. Actividad de bacterias patógenas frente al tipo de extracto y el control positivo.

Con respecto a los microorganismos utilizados en el ensayo experimental, el que presentó mayor sensibilidad al ser analizado con todos los extractos en general fue *S. aureus* ATCC 25923 con una media del diámetro de halo de inhibición de 29,0 mm, seguido por *E. coli* con 26,0 mm, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* ATCC 25922 todos con la medida de 25,0 mm y finalmente *Klebsiella pneumoniae* con un diámetro de 24,0 mm; como se muestra en la Figura 11.

5.4.2 Análisis de datos para levaduras patógenas del género *Candida*

Tabla 16. Resultados estadísticos de la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para levaduras patógenas del género *Candida*.

ANOVA de un factor					
Diámetro de la zona de inhibición (mm) 100 mg/mL					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Extractos	1417,360	4	354,340	208,435	,000
Cepas de <i>Candida</i>	34,000	20	1,700		
Total	1451,360	24			

Los resultados obtenidos en la Tabla 16 nos muestran que los grupos definidos por tipo microorganismo, en este caso cepas patógenas de *Candida* y tipo de extracto orgánico, poseen diferencia significativa de la actividad inhibitoria, el estadístico F, lleva asociado un valor $p < 0,05$, lo que señala que las interacciones entre los factores poseen un efecto significativo sobre el diámetro del halo de inhibición.

Tomando en cuenta la diferencia significativa que mostraron los factores evaluados: Microorganismos: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*; Extracto de *Luma chequen* en hexano, diclorometano, etanol, agua y Fluconazol como control positivo; se realizó pruebas de comparaciones múltiples de medias de Tukey, cuyos resultados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 17. Subconjuntos homogéneos - DHS de Tukey generales (solventes de extracción utilizados frente patógenas del género *Candida*).

	Tipo de extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	Diclorometánico	5	6,60		
	Acuoso	5	6,80		
	Hexánico	5	7,20		
	Etanólico	5		19,00	
	Fluconazol – (Control positivo)	5			24,60
	Sig.		,948	1,000	1,000
Tukey B ^a	Diclorometánico	5	6,60		
	Acuoso	5	6,80		
	Hexánico	5	7,20		
	Etanólico	5		19,00	
	Fluconazol –(Control positivo)	5			24,60

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5.000.

En la comparación de medias de los extractos orgánicos de *Luma chequen* “arrayán”, la Tabla 17, demuestra que los extractos con diclorometano (6,6 mm) y agua (6,8 mm) presentan actividad inhibitoria más baja con respecto a sus medias, seguida del extracto con hexano (7,2 mm); en cambio el extracto etanólico presentó el mayor valor (19 mm) en la media del diámetro del halo de inhibición en el crecimiento de las cepas patógenas de *Candida* (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*), lo cual nos indican que es el extracto más representativo ya que presenta mayor actividad inhibitoria con respecto a los extractos del subgrupo 1 y difiere significativamente de estos.

Tabla 18. Intervalos generales de confianza al 95% (solvente de extracción frente a patógenos del género *Candida*).

Descriptivos

Extractos	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Hexánico	5	7,20	2,168	,970	4,51	9,89	6	11
Diclorometánico	5	6,60	,894	,400	5,49	7,71	6	8
Etanólico	5	19,00	,707	,316	18,12	19,88	18	20
Acuoso	5	6,80	1,304	,583	5,18	8,42	6	9
Fluconazol – (Control positivo)	5	24,60	,894	,400	23,49	25,71	24	26
Total	25	12,84	7,776	1,555	9,63	16,05	6	26

En la Tabla 18 presenta los resultados obtenidos al analizar el efecto de los extractos orgánicos sobre el crecimiento de cepas patógenas del género *Candida*, haciendo énfasis en el extracto etanólico que presentó el mayor valor de la media del diámetro del halo de inhibición de 19,00 mm con límites entre $18,12 \leq \mu \leq 19,88$ mm y el control positivo Fluconazol (24,60mm) con límites entre $23,49 \leq \mu \leq 25,71$ mm. Para todos los extractos evaluados el intervalo de confianza al 95 % presenta límites entre los cuales los datos de los halos de inhibición de los extractos con hexano, diclorometano y agua se traslapan entre sí, es decir que comparten valores de diámetro de halo de inhibición.

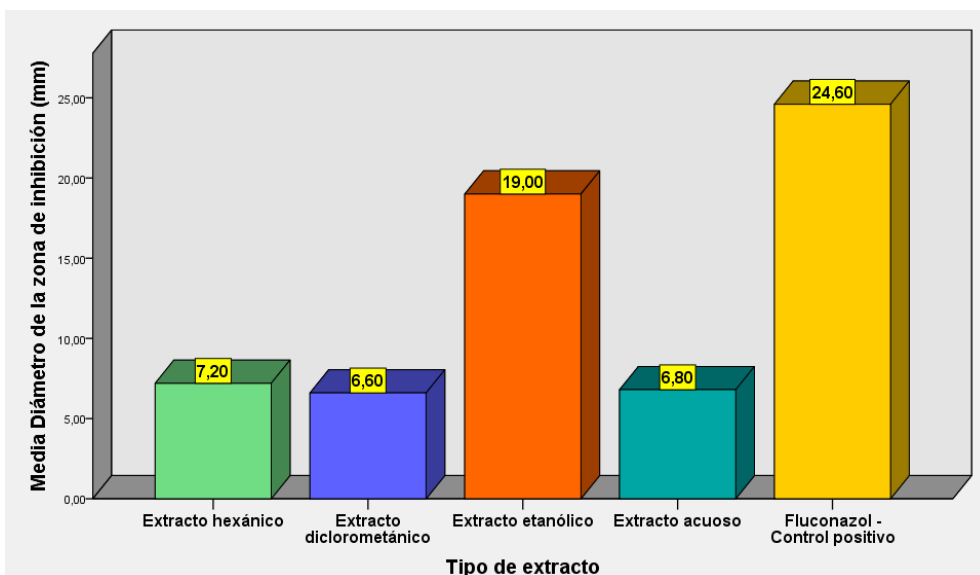


Figura 12. Media del diámetro del halo de inhibición, según el tipo de extracto y el control positivo frente a patógenos del género *Candida*.

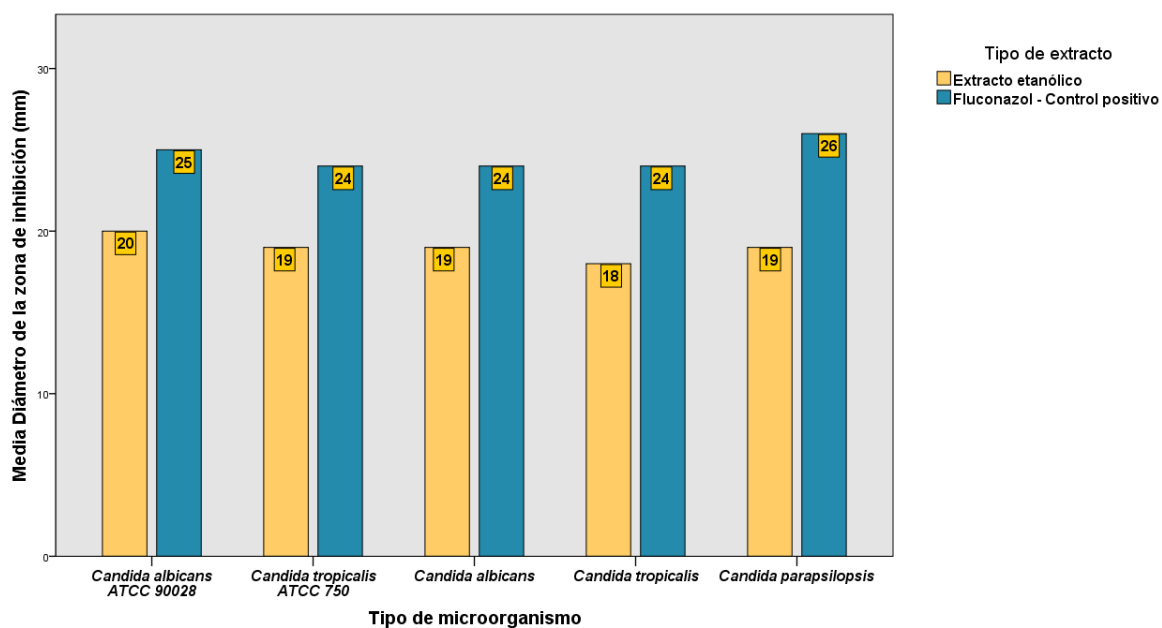


Figura 13. Media del diámetro del halo de inhibición del extracto etanólico comparado con el control positivo frente a patógenos del género *Candida*.

La Tabla 17 señala que el control positivo para patógenos del género *Candida* (Fluconazol) presentó una media de halo altamente significativa, en comparación a los halos observados con los extractos evaluados, además se comprobó que el extracto etanólico mostró mayor actividad inhibitoria frente a 5 a los patógenos del género *Candida* evaluados en éste estudio (Figura 14), representando en promedio un 77,2% del halo obtenido por Fluconazol (Figura 13).

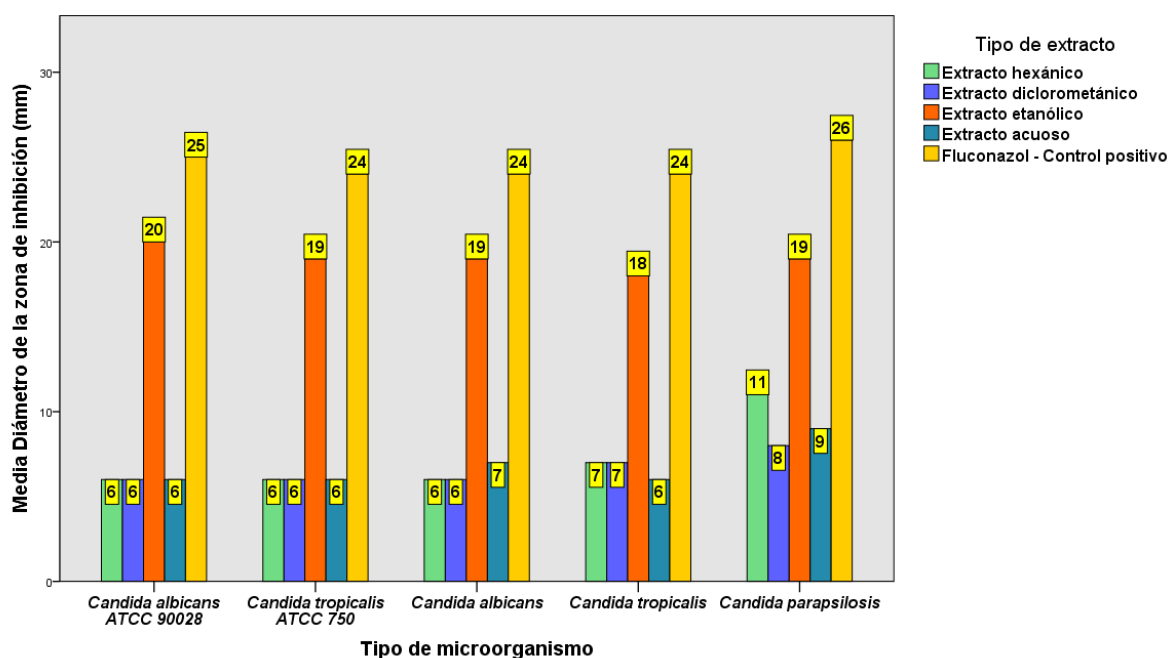


Figura 14. Actividad de patógenos del género *Candida* frente al tipo de extracto y el control positivo.

Con respecto a los microorganismos utilizados en el ensayo experimental, el que presentó mayor sensibilidad al ser analizado con todos los extractos en general fue *Candida albicans* ATCC 90028 con una media del diámetro de halo de inhibición de 20,0 mm, seguido por *C. albicans* con 19,0 mm, *C. tropicalis* ATCC 750 con 19,00 mm, *C. parapsilosis* con 19,00 mm y finalmente *C. tropicalis* con un diámetro de 18,0 mm; como se muestra en la Figura 14.

5.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico

Los resultados del ensayo cuantitativo de la CMI del extracto etanólico de *Luma chequen* “arrayán” se observan en la Tabla 19 y Figura 15, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para patógenos bacterianos oscila entre 6,25 –3,125 mg/mL, siendo *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* los patógenos bacterianos de origen hospitalario que presentaron mayor sensibilidad a diferencia de las cepas de referencia.

Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para levaduras del género *Candida* se encontró que *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* de origen hospitalario presentaron una CMI de 1,56 mg/ mL como se muestra en Tabla 20 y Figura 16. Por Lo que se consideran como los patógenos más sensibles de este estudio ya que presentaron la CMI más baja, siendo este el primer reporte del extracto etanólico de *Luma chequen* sobre esta actividad frente a estos patógenos oportunistas.

Tabla 19. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Luma chequen* “arrayán” frente a cepas patógenas bacterianas.

	CMI (mg/ml)
Cepas de referencia	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6,25
Cepas de origen hospitalario	
<i>Escherichia coli</i>	6,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,125
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,125
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,125

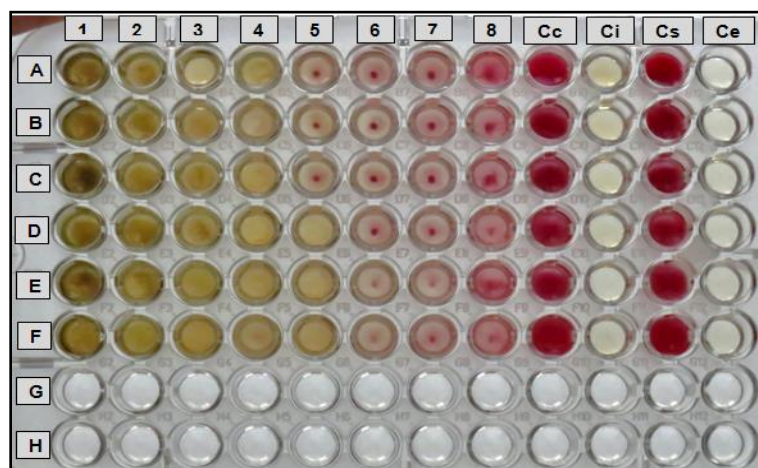


Figura 15. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Luma Chequen* frente a cepas patógenas bacterianas.

Cepas patógenas: (A): *Escherichia coli* ATCC 25922; (B): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; (C): *Escherichia coli*; (D): *Klebsiella pneumoniae*; (E): *Staphylococcus aureus*; (F): *Staphylococcus epidermidis*

Diluciones (mg/mL): (1): 50; (2): 25; (3): 12,5; (4): 6,25; (5): 3,125; (6): 1,56; (7): 0,78; (8): 0,39

Controles: (Cc): Control de crecimiento microbiano; (Ci): Control de inhibición por Gentamicina (80 mg/mL); (Cs): Control del solvente (DMSO al 5%) ;(Ce): Control de esterilidad del medio de cultivo.

Tabla 20. Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Luma chequen* “arrayán” frente patógenas del género *Candida*.

	CMI (mg/ml)
Cepas de referencia	
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	3,125
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	3,125
Cepas de origen hospitalario	
<i>Candida albicans</i>	3,125
<i>Candida tropicalis</i>	1,56
<i>Candida parapsilosis</i>	1,56

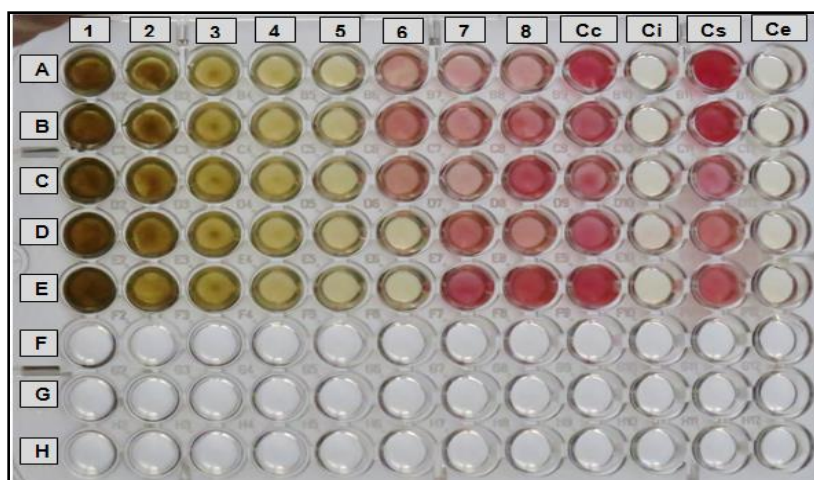


Figura 15. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Luma chequen* frente a patógenas del género *Candida*.

Cepas patógenas: (A): *Candida albicans* ATCC 90028; (B): *Candida tropicalis* ATCC 750; (C): *Candida albicans*; (D): *Candida tropicalis*; (E): *Candida parapsilosis*.

Diluciones (mg/mL): (1): 50; (2): 25; (3): 12,5; (4): 6,25; (5): 3,125; (6): 1,56; (7): 0,78; (8): 0,39

Controles: (Cc): Control de crecimiento microbiano; (Ci): Control de inhibición por Fluconazol (0,2 mg/mL); (Cs): Control del solvente (DMSO al 5%); (Ce): Control de esterilidad del medio de cultivo.

6. DISCUSION

Con la finalidad de contribuir al conocimiento etnobotánico de plantas medicinales de la familia Myrtaceae se realizó el estudio de actividad antimicrobiana de *Luma chequen* “arrayán”, planta nativa altoandina del sur del Perú, utilizada por nuestros ancestros para aliviar diversos problemas de la salud por sus distintas propiedades medicinales, además de utilizarse como una planta mágico –religiosa, sin embargo poco conocida en el ámbito científico, existiendo mayormente informaciones etnobotánicas como lo señala Arellano (1992); Muñiz (1992); Goncalves *et al.*, 2001; así mismo estas descripciones concuerdan con Mantilla & Olazábal (2008) y Reynel *et al.*, 2009.

Según bibliografía consultada y especializada, existen especies vegetales de familia de Myrtaceae a las que se les llama con el mismo nombre vulgar “arrayán” en otros países como por ejemplo Ecuador, Chile, Colombia, Bolivia y Venezuela, sin embargo no son la especie vegetal en estudio, pero si especies parecidas o de la familia, no obstante en lo expuesto por Huamaní y Ruiz (2005); Maldonado (2008); Lizcano & Vergara (2008); Gómez (2010); Wen *et al.*, (2011); Pío *et al.*, (2013); estas plantas presentan actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos patógenos.

Sin bien no hay referencias de estudios realizados con extractos orgánicos de *Luma chequen* (arrayán) que presenten actividad antimicrobiana, Gongalves *et al.*, 2001 reporta actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie vegetal en estudio, resultado que respalda la presente investigación.

En la presente investigación se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos *Luma chequen* “arrayán” frente a patógenos bacterianos (*Escherichia coli*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) y fúngicos (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*) aislados de hemocultivos y cepas controles ATCC (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* 750).

El método de extracciones sucesivas basados en la diferencia de polaridad de los solventes utilizados, mostró resultados favorables ya que el extracto crudo contiene una mezcla de metabolitos bioactivos que presentan actividad biológica, que no necesariamente pueden tener actividad antimicrobiana, posiblemente estos metabolitos actúen como antagonistas, por eso mientras mayor fraccionamiento haya, mayor será la inhibición. Tal es así, Ávila *et al.*, (2006) evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Diplostephium tolimense* Cuatrec., determinando que el tamaño de los halos de inhibición aumentaban significativamente a medida que se fraccionaba la muestra.

Se eligió el método modificado de difusión en pocillos porque es un método, que a diferencia del uso de discos de papel, concentra una mayor cantidad del extracto facilitando la evaluación del potencial antimicrobiano como lo afirma Magallanes *et al.*, (2003) lo que concuerda con Rojas *et al.*, (2005) quien señala que el método modificado de pocillos en agar es más sensible que el método Kirby- Bauer; por lo tanto recomienda el uso de este método para realizar ensayos de actividad antimicrobiana en plantas medicinales bajo las condiciones estandarizadas. Así mismo Huamaní & Ruiz (2005) refieren tener buenos resultados con este método.

En cuanto a los controles se usó la Gentamicina como control positivo bacteriano teniendo en cuenta que es un antibiótico de amplio espectro y actúa inhibiendo la síntesis proteica de Gram negativos y Gram positivos; y el Fluconazol como control positivo

fúngico ya que posee actividad frente a la mayoría de las especies del género *Candida*, además de su excelente biodisponibilidad y baja toxicidad.

Para diluir los extractos orgánicos se utilizó el dimetilsulfóxido (DMSO) al 5%, asimismo como control negativo. Es importante resaltar que no presentó actividad tóxica en ningún microorganismo evaluado, lo cual ratifica que el responsable de la actividad antimicrobiana es el concentrado de los componentes fitoquímicos de la planta, en este caso taninos, flavonoides, alcaloides, triterpenos y fenoles, los cuales han sido determinados en el presente trabajo.

Para obtener diferentes extractos se usaron solventes orgánicos de baja (hexano), mediana (diclorometano), alta (etanol) polaridad y agua como solvente universal para hacer una infusión acuosa, obteniendo así cuatro extractos orgánicos, este procedimiento permitió la recuperación de principios activos (metabolitos secundarios) de *Luma chequen* “arrayán”.

Con respecto a los solventes de extracción utilizados en el presente trabajo se determinó que el etanol fue el solvente de mayor rendimiento y el más efectivo en cuanto a la inhibición del crecimiento de los patógenos se refiere.

En cuanto a la sensibilidad de los patógenos bacterianos, los estafilococos fueron los microorganismos más sensibles a la actividad de los 4 extractos evaluados debido a que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular compuesta de una gruesa capa de peptidoglucano y proteínas; esto hace que los metabolitos polares, sean más permeables y susceptibles a la pared y permita el paso de sustancias a su interior ocasionando la muerte microbiana, tal como lo señala Cowan *et al.*,(1999); Bruneton (2001). Lo que es

representativo ya que en la actualidad, estos microorganismos son los principales causantes de infecciones nosocomiales, debido a su amplia distribución, pues forma parte de la flora normal de mucosas y piel, sus numerosos factores de virulencia y su resistencia a diferentes antibióticos como reporta Reimer *et al.*, (1997); Pazos *et al.*, (2001); Paz *et al.*, (2008).

En lo que concierne a las levaduras, *Candida albicans* ATCC 90028 , seguidamente de *Candida parapsilosis* y *Candida albicans* con igual media del diámetro de halo de inhibición, lo que resulta interesante es que estos microorganismos son considerados patógenos oportunistas, debido a que encuentran en la microflora normal colonizando desde la cavidad bucal hasta el recto; pero cuando se rompe este equilibrio estos microorganismos empiezan a proliferar y puede dar lugar a un conjunto de enfermedades denominadas candidiasis y candidemias como lo refiere Pfaller en el 2007, en diversos estudios en un estudio sobre candidiasis invasiva, lo que concuerda con Trofa *et al.*.,2008 y Bonifaz (2010).

El hecho que *Luma chequen* (arrayán) presente actividad antimicrobiana frente microorganismos patógenos Gram positivos, Gram negativos y levaduras permite plantear la interrogante de ser fuente de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano de amplio espectro con acción dirigida y específica hacia cada grupo microbiano.

La infusión (extracto acuoso) de *Luma chequen* es la forma común en que la consumen los pobladores, en este estudio el extracto acuoso no mostró efecto antifúngico alguno (Tabla 12 y Figura 8), sin embargo sobre patógenos bacterianos como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

presentó una mediana actividad inhibitoria como se muestra en la (Tabla 11 y Figura 5), lo que indica que esta especie vegetal posee metabolitos secundarios polares, de amplio espectro de acción antibacteriana.

Cabe resaltar que el uso tradicional por el poblador es en infusión y durante varios días, además es necesario tomar en cuenta que los resultados obtenidos son *in vitro* y es posible que difiera con el efecto *in vivo*, porque el proceso de biotransformación en el individuo no siempre produce metabolitos polares inactivos e hidrosolubles, también es posible que se obtengan metabolitos con mayor actividad biológica y sean más reactivos según lo señala Florez (2003).

Diversos trabajos recomiendan utilizar el etanol (solvente polar) porque posee una fuerte capacidad de extracción de los constituyentes activos responsables de la actividad antimicrobiana presentes en la planta. Es considerado uno de los solventes con gran actividad de extracción de metabolitos secundarios en las plantas, además, es no tóxico en los bioensayos, no así en el caso del hexano y diclorometano según lo señala Voigt (1982), asimismo Selles (1992) y Villacís (2009) concuerdan con estas recomendaciones.

Considerándose que el extracto etanólico de *Luma chequen* (arrayán) resultó ser el más efectivo, se podría afirmar que la actividad antimicrobiana presentada por éste se debe al tipo de solvente utilizado, ya que etanol tiende a arrastrar gran cantidad de compuestos polares como compuestos fenolicos ,taninos, flavonoides, y según Lock (1988), Valencia (1995) y Villacís (2009), estos compuestos han reportado propiedades antimicrobianas, destacándose la acción de inhibir la síntesis de la pared celular ó a su vez inhibir la síntesis de ADN o ARN, ya que la estructura plana que tienen éstos compuesto es similar a la de las bases púricas y pirimídicas, y se pueden intercalar formando puentes de

hidrógeno, alterando así la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos según lo señala Selles (1992); Cowan (1999) y Bruneton (2001), para el caso del género *Candida* éstos compuestos probablemente pueden actuar inhibiendo la biosíntesis de ergosterol o de otros esteroides presentes en la pared celular de la levadura, alterando su permeabilidad; como consecuencia se produce la pérdida de elementos intracelulares esenciales según lo expuesto por Clancy *et al.*, 2005; Bonifaz (2010).

La resistencia de las bacterias gram negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) a extractos vegetales han sido documentadas anteriormente y se ha concluido que esta resistencia se debe a las diferencias estructurales en la pared celular entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, ya que en estas últimas la membrana celular actúa como una barrera para muchas sustancias medioambientales y antibióticos según Murray *et al.*, 2007 y Koneman *et al.*, 2008.

Los diámetros obtenidos de los halos de inhibición del extracto etanólico de *Luma chequen*, en comparación con los diámetros de los halos de inhibición con los antibióticos utilizados que representan el 100%, fueron casi similares, evidenciándose así inhibición del crecimiento microbiano, demostrando así su efectividad. Para el caso de bacterias el extracto etanólico de arrayán presentó mayor efectividad en la inhibición del crecimiento de estos patógenos, representando el 90,02% del halo obtenido por Gentamicina, antibiótico utilizado como control positivo y en el caso de levaduras del género *Candida* el extracto etanólico represento el 77,2% del halo obtenido por Fluconazol como se puede observar en las Figuras 6 y 9 respectivamente. Esto se debe a que los antimicrobianos utilizados son altamente concentrados y purificados los cuales contienen parámetros ya estandarizados, mientras que los extractos probados en éste estudio son una mezcla de componentes fitoquímicos que pueden interactuar en sinergismo o individualmente, razón

por la cual Bruneton (2001) y García (2006) explican, que es necesario entender que la actividad biológica potente y específica es una propiedad poco usual en metabolitos secundarios.

De acuerdo a los resultados obtenidos para patógenos bacterianos, el extracto con hexano presento una mínima inhibición y el extracto diclorometánico solamente mostró una alta inhibición frente a la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como se muestra en la Figura 7 y Tabla 11, y en cuanto a las levaduras del género *Candida* los extractos de hexano, diclorometano y agua no mostraron actividad alguna (Figura 10 y Tabla 12).

Teniendo en cuenta lo expuesto, es posible que la actividad sobre los microorganismos no se deba a la acción de un único principio activo sino al efecto sinérgico de varios de ellos que en la planta se encuentren en proporción minoritaria, además se debe considerar que el rendimiento de los extractos puede variar dependiendo de la naturaleza química de los metabolitos y la polaridad del solvente utilizado.

Probablemente en estos extractos existen compuestos orgánicos de baja polaridad que son capaces de inhibir el crecimiento de estos organismos, considerando la importancia de realizar nuevos estudios con otros solventes de polaridad creciente, concentraciones mayores y realizando evaluación de fracciones cromatográficas que muestren algún resultado positivo.

El extracto etanólico fue capaz de inhibir a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, seguido por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae*; *Candida albicans* ATCC 90028, seguido por *Candida albicans*, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* y *Candida*

tropicalis resultados que concuerdan lo expuesto por Goncalves *et al.*, (2001) en donde la reporta actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Luma chequen* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 25923 y *C. albicans*; Lizcano y Vergara (2008) señalan actividad inhibitoria del aceite esencial *Myrciantes rhopaloides* “arrayán” perteneciente a la familia Myrtaceae frente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *C. albicans*. Así mismo Maldonado (2008) señala la actividad antibacteriana de esta especie sobre *Staphylococcus aureus* y Boderó (2010) concluye que los extractos fluidos de la misma especie contienen principios activos implicados en la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Por otro lado Gómez (2010) reporta que el extracto etanólico de *Myrciantes hallii* “arrayán” posee actividad inhibitoria frente *Klebsiella pneumoniae* y *C. albicans*.

En lo que concierne a los valores de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los patógenos bacterianos evaluados en el presente estudio oscila entre 6,25 –3,125 mg/mL (Tabla 19 y Figura 11), es importante mencionar que para esta especie no se encontraron reportes sobre la CMI, sin embargo para el género *Psidium* perteneciente a la familia Myrtaceae existen varios reportes donde se menciona la actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos. Por ejemplo, Gnan y Demello (1999) reportaron que el extracto de hoja de *Psidium guajava* presentó actividad antimicrobiana para nueve cepas diferentes de *S. aureus* con una concentración 6,5 mg/ml. Así mismo Pío *et al.*, (2013) señala que el extracto metanólico de *Psidium sartorianum* “arrayán”, presentó mayor sensibilidad a *Staphylococcus aureus* (CMI 2 mg/mL; CMB 2-4 mg/mL). Por otro lado, Miranda *et al.*, (2012) reporta una CMI de 7,50 mg/ml del el extracto hexánico de corteza de *Psidium friedrichsthalianum* para *S. aureus*.

Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se encontró que *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis* presentaron una CMI de 1,56. mg/ mL con el extracto etanólico (Tabla 20 y Figura 12). Por Lo que se consideran como los más sensibles ya que presentaron la CMI más baja, siendo este el primer reporte del extracto etanólico de *Luma chequen* sobre esta actividad frente a estos patógenos oportunistas.

Wen *et al.*, (2011) reporta actividad para el extracto de etanólico de *Psidium acutangulum* perteneciente a la familia Myrtaceae, en un rango de 16-512 µg/mL para varias especies de *Candida*; Asimismo Ruiz (2013) señala que los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de las hojas de *Psidium guajava* mostraron una muy buena actividad antifúngica (CMI≤100 µg/mL) contra las 2 cepas de *Candida albicans*, semejante a Huamani & Ruiz (2005) reportaron actividad del extracto etanólico de *Psidium guajava* contra *Candida albicans* a 250 µg/mL.

Las concentraciones a las cuales se produjo la inhibición son altas con respecto a otros estudios hechos con diferentes tipos de plantas; sin embargo, se debe tener en cuenta que se está trabajando con extractos crudos que contienen otros metabolitos o impurezas sin actividad antimicrobiana.

Según Domínguez (1973), Lock (1988) y Valencia (1995) los metabolitos secundarios son responsables de las extensas y variada acciones farmacológicas, destacándose a sí mismo la actividad antimicrobiana de taninos, flavonoides y fenoles en diversos estudios realizados a diferentes especies vegetales realizadas por Cowan (1999); Alzamora *et al.*, (2001); Goncalves *et al.*, (2001); Obregón (2003); Mantilla *et al.*, (2008); Añanca (2009); Gómez (2010).

La Tabla 3 muestra los resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares de *Luma chequen*, destacando un alto contenido de metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, fenoles, alcaloides, triterpenos y esteroides, leucoanticianidina lo cual confirma lo expuesto por Muñiz (1992) y Carhuapoma (2002). Según estos autores *Luma chequen* contienen flavonoides (quercetina, rutina y quercetin-3-metil éter), taninos, triterpenos y esteroides, leucoantocianidinas, catequinas, fenoles libres y aceites esenciales (1,8-cineol, mirtol), los cuales podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana de esta planta ,además de contener resinas, principio amargo, vitamina C, ácidos (cítrico, tánico y málico), hidrocarburos cafeínico y heterósidos.

Se conoce que compuestos encontrados por Goncalves *et al.* (2001) y Carhuapoma (2006) en el arrayán, como el cineol reducen la división celular y que el limoneno, el α -pineno y el β -pineno inhiben el consumo de oxígeno según Peñuelas *et al.*, 1996 y presentan efecto farmacológico estimulante sobre las células epiteliales, incrementando la motilidad del epitelio ciliado de los bronquios; se sabe que el 1-8 cineol inhibe la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Koitabashi *et al.*, 1996), además es conocido por su actividad antiséptica y expectorante; y que los compuestos fenólicos, principalmente el flavonoide quercetina sería probablemente el responsable de la acción antimicrobiana, todos estos compuestos estarían actuando en sinergismo sustentando su uso popular como expectorante, antiinflamatorio y conservante.

Teniendo en cuenta la aceptación que existe por la medicina natural de parte de la población y de acuerdo a los resultados obtenidos, este estudio permite valorar la propiedad antimicrobiana del arrayan peruano frente a los principales patógenos aislados de hemocultivos.

7. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Luma chequen* “arrayán” presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas de referencia, así como a patógenos Gram positivas, Gram negativas y levaduras, aislados de origen hospitalario en comparación con los extractos de hexano y diclorometano que no mostraron actividad inhibitoria significativa.
2. El extracto acuoso no mostró efecto antifúngico, sin embargo sobre algunos patógenos bacterianos presentó un mediano poder inhibitorio.
3. *Luma chequen* “arrayán” posee principios activos con acción antimicrobiana, hecho corroborado por los valores CMI, lo cual contribuye al fortalecimiento y credibilidad de los conocimientos ancestrales.
4. El tamizaje fitoquímico de *Luma chequen* determinó la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, triterpenos y/o esteroides, alcaloides, y leucoantocianidinas, que pueden ser los responsables de la actividad antimicrobiana.

8. RECOMENDACIONES

1. Continuar la investigación de *Luma chequen* y otras especies vegetales, para la búsqueda específica de compuestos con actividad antimicrobiana, para lo cual se propone ensayar con mas patógenos de importancia médica.
2. Evaluar extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad y otras condiciones que asemejen su uso tradicional, para validar el conocimiento etnobotánico de las plantas medicinales.
3. Realizar estudios encaminados en aislar, identificar, separar y elucidar la o las molécula(s) presente en el extracto etanólico de *Luma chequen* responsable de la actividad antimicrobiana y determinar su mecanismo de acción, con el fin de generar alternativas para la obtención de nuevos antimicrobianos de amplio espectro a partir de una fuente de origen natural.
4. Determinar la eficacia y/o toxicidad de los compuestos activos en modelos *in vivo* con el fin de determinar la estabilidad del extracto obtenido frente a agentes físicos y químicos que puedan interferir en la actividad antimicrobiana descrita en el presente trabajo.
5. Profundizar estudios sobre los rendimientos y concentraciones de los metabolitos secundarios identificados en la presente investigación, pues de ello dependerá si vale la pena o no su aprovechamiento por parte de la industria o la medicina.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Álvarez F., Olaechea P., Palomar M., Insausti J., López M. Epidemiología de las bacteriemias primarias y relacionadas con catéteres vasculares en pacientes críticos ingresados en servicios de medicina intensiva. *Med. Intensiva* [online]. 2010, vol.34, n.7 [citado 05-04-2014], p 437-445. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-56912010000700001&lng=es&nrm=iso. ISSN 0210-5691.

Alzamora Libertad, Morales Liliana, Armas Lourdes, Fernández Gilma. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Revista Peruana de Biología*, 2001, Vol. 62, nº 2, p 156 -161.

Añanca, E. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis Bachiller. Facultad de Farmacia y Bioquímica: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, 2009.

Arellano. P. El Libro Verde. Guía de Recursos Terapéuticos Vegetales. En: INMETRA. Ministerio de Salud. Lima, 1992; Vol. 33, p. 46-53.

Ávila, Liliana; Baquero Eduard; Viña Amparo; Murillo Elizabeth. Actividad antibacteriana de *Diplostephium Tolimense Cuatrec.* (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. *Vitae* [en línea] 2006, 13 (Marzo): [fecha de consulta: 2 de

mayo de 2014] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169813260008> ISSN 0121-4004

Ayala J, Alemán M, Guajardo C, Rivera N. Bacteriemias: incidencia y resistencia antimicrobiana. Tendencia a través de dos décadas de seguimiento. Avances Ciencias Clínicas, 2006 Vol.8, No. 23, p 4 -9.

Becerra M. Tantaleán J. Suárez V., Alvarado M., Candela J. y Urcia F. Epidemiologic surveillance of Nosocomial infections in a Pediatric Intensive Care Unit of a developing country. *BioMed Central Pediatrics*, 2010, Vol.10, n°66. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2431/10/66>

Bodero Poveda María Verónica. Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana (*in vitro*) de los extractos fluidos de arrayán y pumín y su aplicación en una pasta dentífrica. Asesores. Dra. Susana Abdo y Dra. Janneth Gallegos Tesis de Grado Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo Escuela de Bioquímica y Farmacia .Riobamba - Ecuador.2010.

Bonifaz A., Micología Médica Básica, 3a edición, México, D.F., McGraw-Hill Editores S.A. 2010.

Brako, L. and Zarucchi, J.L. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. Monographs in Systematic Botany.1993. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. Vol. 45, p 1286.

Bruneton, J. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2da. Edición, Editorial Acribia S.A. Zaragoza España, 2001. 1099 p. ISBN: 9788420009568

Cañigüeral Salvador, Dellacassa Eduardo, Bandoni Arnaldo L. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 2003, Vol. 22, n°. 3, [Citado 15-04-2014] p. 265-278. Disponible en: http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP_22_3_6_1_S966JS548J.pdf

Carhuapoma YM. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (molina) A. Gray “arrayán”. Asesores Dr. Salvador Cañigüeral y Roser Vila. Tesis de Maestría Unidad de Post Grado, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima - Perú 2006

Carhuapoma YM. Plantas medicinales aromáticas nativas de la provincia de Huamanga y sus perspectivas económicas. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, UNSCH, Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho, 2002

Castroviejo Santiago. Flora ibérica: Haloragaceae-Euphorbiaceae. Plantas vasculares de la península ibérica e islas baleares, 1997 Editorial Lit. II. Real Jardín Botánico (Spain) vol 3. Capitulo XCV, Pag 73 – 81. ISBN: 84- 00- 06 221-3

Clancy J., Yu, V., Morris A., Snyderman D., Nguyen M. Fluconazole MIC and the Fluconazole Dose/MIC Ratio Correlate with Therapeutic Response among Patients with Candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005, Vol. 49, n°8, p.3171–3177

Cowan M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 1999. Vol. 12, N° 4, p. 564 – 582.

Cronquist Arthur. An integrated system of classification of flowering plants. Editorial Columbia University Press. New York; 1981. [citado 10-04-2014]. Disponible en: www.springerlink.com/index/CK87741270N417G2.pdf ISBN 0-231-03880-1

Domínguez, X. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Lima, Perú, Editorial Limusa S.A. p 281.

Finkelstein R, Fusman R, Oren I, Kassis I, Hashman N. Clinical and epidemiologic significance of coagulase negative Staphylococci bacteremia in a tertiary care university Israeli hospital. Am J Infect Control 2002; Vol., 30: 21-25.

Flores W., Illescas R., Rodríguez L., Hidalgo J., Paz E., Mendivil S., Reporte de datos acumulados de susceptibilidad antimicrobiana periodo: 1 Enero 2009 – 30 Junio 2010. Reportes del servicio de microbiología del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. 2011.

Florez J. Farmacología humana. 4ta ed. Barcelona, España: Masson 2003, p. 57-73.

García C, Pardo J, Seas C. Bacteriemia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post operado: Reporte de un caso. Rev Med Hered 2003; Vol., 14, n°4, p, 221- 223.

García Hernández. A., García Vázquez E., Hernández Torres A., Ruiz J., Yagüe G., Herrero J., Gómez Joaquín. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. Rev Esp Quimioter 2011; Vol 24 n° 2, p 57-66.

García, J. 2006. Breves apuntes sobre productos naturales y plantas medicinales. Pinar del Río, Cuba: Universidad Hermanos Saíz Montes de Oca. 191 p.

Garrett D, Jochimsen E, Murfitt K, Hill B, McAllister S, Nelson P, Spera R, Sall R, Tenover F, Johnston J, Zimmer B, Jarvis W. The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; Vol., 20 p, 167-170.

Gnan SO, Demello MT. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous goiaba extracts. *J Ethnopharmacol*. 1999. Vol. 68, p: 103 - 108.

Gómez Cruz Cristina Dayana. Evaluación de la Actividad Antibacteriana Antimicótica de los Extractos de *Myrciantes Hallii* (Arrayán), *Amaranthus Asplundii* (Ataco), *Peperomia Peltigera* (Pataku Yuyo), especies reportadas en Peguche – Imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* Causantes de enfermedades Bucofaríngeas. Tesis Titulo Profesional. Escuela Politécnica del Ejército. Escuela Académica Profesional .Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí 2010.

Goncalves MJ, Calvaleiro C, Salgueiro LR, Proenca AC. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Luma chequen*. University of Coimbra. Portugal; 2001, Vol. 18, nº 1, p 108-110. Disponible en: http://the-medical-dictionary.com/dimethyl_sulfoxide_article_5.htm

Hill, A. F. 1965. *Botánica Económica Plantas útiles y productos vegetales*. 1a edición. Ediciones Omega. p 615.

Hoyos A, Rivera O, Hoyos C, Mesa C, Alfaro J. Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. *Revista CES Medicina* 2007; Vol 21, n° 2, p: 31-39

Huamaní Achata María E. y Ruiz Quiroz Julio R. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Asesora. Mirtha Roque Alcarráz .Tesis Titulo Profesional. UNMSM. Escuela Academica Profesional de Farmacia y Bioquímica, Lima. 2005.

Instituto Nacional De Salud (INS) .Manual De Procedimientos y Técnicas de Laboratorio para la Identificación de los Principales Hongos Oportunistas Causantes de Micosis Humanas. Serie De Normas Técnicas N° 44 Lima, 2007.

Jaramillo VH, Macha GM, Mejía QM. Determinación de la actividad hipocolesterolémica en extractos de parte aérea de *Luma chequen* “rayán castilla”. Ica; 2004.

Kawasaki, Lucia y Holst, Bruce K. Myrtaceae endémicas del Perú. *Rev. peru biol* .[online]. 2006, vol.13, n.2 [citado 29-03-2014], pp. 463-468. Disponible en: <[http://KAWASAKI, Lucia y HOLST, Bruce K.. Myrtaceae endémicas del Perú. Rev. peru biol. \[online\]. 2006, vol.13, n.2 \[citado 2014-03-29\], pp. 463-468 . Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332006000200082&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1727-9933](http://KAWASAKI, Lucia y HOLST, Bruce K.. Myrtaceae endémicas del Perú. Rev. peru biol. [online]. 2006, vol.13, n.2 [citado 2014-03-29], pp. 463-468 . Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332006000200082&lng=es&nrm=iso)

Koitabashi, R, Suzuki T., Kawazu T., Sakai A., Kuroiwa H., Kuroiwa T. 1,8- cinneole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research*. 1997. Vol. 110, p. 1-6.

Koneman Elmer W., Allen Stephen. Koneman. Diagnostico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. 6ta Edición Argentina. Ed. Médica Panamericana. 2008. ISBN: 978-950-06-0895-4

Labbe C, Coll J, Connolly JD, Faine F, Farrugia LJ, Rycroft S. Bioactive flavanones from *Luma chequen*. Collect Czech.Chem. Commum .Glasgow University library. Scotland; 2002.Vol 67, p 115-123.

León Jorge; Montero Stephanie; Albán Joaquina; Tomas Gloria E.; Aponte Juan, Noceda Manuel. Actividad antimicrobiana de tres especies vegetales de uso en medicina natural peruana. XIX REUNIÓN CIENTÍFICA ICBAR.2010

Lizcano Ramón Andrea Jimena y Vergara González. Jenny Lisseth. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Etanólicos y/o Aceites Esenciales de las Especies Vegetales *Valeriana Pilosa*, *Hesperomeles Ferruginea*, *Myrcianthes Rhopaloides* Y *Passiflora Manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Asesores: María Eugenia Torres y Freddy Alejandro Ramos. Tesis Título Profesional. Pontificia Universidad Javeriana .Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá D.C. Colombia 2008

Lock de Ugaz Olga. Investigación Fitoquímica .Métodos de Estudios de Productos Naturales. Fondo Editorial. PUCP 1era Edición. Lima Perú 1988. ISBN84-8390-952-9

Loza E, Planes A y Rodríguez M. Hemocultivos. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2003, [citado 29-03-2014] p 1-20. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia3.pdf>

Magallanes C., Córdova C., Orozco R. Actividad antibacteriana de extractos etanolicos de macroalgas marinas de la costa del Perú. *Revista peruana de Biología*. 2003, Vol. 10, n°2, p. 125-132.

Maldonado Elena. “Análisis de la composición del aceite esencial de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) *McVaugh, Myrtaceae*, y evaluación de su actividad biológica. *Revista La granja* (Ecuador). 2008, pp.17-24

Mantilla Holguin J.; Olazábal Castillo O. Las plantas medicinales de nuestra madre tierra “Pachamama Hampi Qhoranchiskuna”. Valle sagrado de los Incas – Cusco .Instituto de ecología y plantas medicinales.2008. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/116895801/Las-Plantas-Medicinales-de-Nuestra-Madre-Tierra-Pachamama-Hampi-Qhoranchiskuna>

Mesa A. C., Bueno S. J., Betancur G. L. Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia*. 2004. Vol 17, n°4, [Citado 16-04-2014] p 325-331. Disponible en : <http://www.seq.es/seq/0214-3429/17/4/325.pdf>

Miranda E., Espinosa J., Centurión D., Velázquez J. & Alor M. Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2012; Vol. 11, n°4,p: 354 – 361 ISSN 0717 7917

Morales Torrealba, Betzaide Kimberli. Identificación de *Candida* spp. aisladas en hemocultivos de pacientes de Retén, utilizando el medio chromagar, y susceptibilidad a Fluconazol y Voriconazol. Asesores: Josefa Díaz, Mary Carmen Gómez. Tesis de Grado Título Profesional .Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias. Cumaná, Estado Sucre.2012

Mostacero LJ, Mejia CF, Gamarra TO. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Edit. Normas Legales. Trujillo; 2002

Muñiz M. Etnobotánica de la flora medicinal de la provincia de Paruro. UNSAAC. Cusco; 1992.

Murray, P., Baron, E., Tenover, J., Tenover, J., Landry, M., & Pfaller, M. Manual de Microbiología Clínica. Editorial ASM. Press Washington DC. 2007. Novena edición. ISBN Edición Original: 0-323-03303-2

National Committee for Clinical and Laboratory Standards (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty –Third Informational; vol. 33 N°1, M100-S23 2013.

National Committee for Clinical and Laboratory Standards. (CLSI) Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved standard M44-A. National Committee for Clinical and Laboratory Standards, Wayne, PA 2004.

Nazar, J. R., Lavados, A., Daher, O., Bischoff, M. C. Análisis microbiológico, epidemiológico y evolución clínica de los pacientes con bacteriemia en el Hospital Zonal de Esquel en el período 2007-2009. *Rev. argent. microbiol.* [online] 2010, vol. 42, nº. 3, p. 151-164 : [Fecha de consulta: 28 de octubre de 2013] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213014867002> ISSN 0325-7541

Nuri K., Yasemin Oz. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of clinical Candida isolates from a university hospital in Turkey over a 5-year period. *Medical Mycology* 2011; Vol 49, nº2, p.126–131. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718609>

Obregón L. Fitoterapia: Importancia de su desarrollo al servicio de salud FITO 2003 Lima.

OMS (1978). The Promotion and Development of Traditional Medicine, Ed. WHO Ginebra., Technical Report Series, No. 622, [Citado 11-04-2014]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s7147e/s7147e.pdf>. ISBN9421206225

OMS, Informe del taller interregional de la OMS sobre el uso de medicina tradicional en la atención primaria de salud. 2007. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16202s/s16202s.pdf>

Organización Mundial de la Salud (OMS). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional.[WHO/EDM/TRM72000.1](http://www.who.int/edm/trm/2000.1). Ginebra: OMS, 2000.

Organización Mundial de la Salud (OMS): Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra: Programa de Medicina Tradicional OMS, 2002. [Citado 12-04-2014] Disponible en: [WHO/EDM/TRM/2002.1](http://www.who.int/edm/trm/2002.1).

Osorio Durango Edison Javier. Aspectos básicos de farmacognosia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.2009. [Citado 12-04-2014] Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/Farmacognosia.pdf>

Paz Rojas, Luis; De León Pandolfi, Darío y Ramírez Ponce, Rafael. Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: Departamento de Cuidados Críticos, Servicio de Cuidados Intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. Acta Médica Peruana [en línea]. 2008, vol. 25, n° 3, p. 140-147. Disponible en <<http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v25n3/a04v25n3.pdf>>.

Pazos Añón R., Fernández Rodríguez R., Paz Vidal I., Tinajas A., Cantón I., Abel V., González R., Martínez R., Gayoso P. , Fernández Álvarez O. Factores pronósticos de la bacteriemia: estudio prospectivo. An. Med. Interna (Madrid) [online]. 2001, Vol.18, n.8 [citado 2013-11-14], pp. 23-28. Disponible en:

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S021271992001000800004&lng=es&nrm=iso. ISSN 0212-7199. <http://dx.doi.org/10.4321/S0212-71992001000800004>.

Pediamécum. Edición 2012. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Gentamicina. Disponible en: <http://www.pediamécum.es>. Consultado en (2014-10-04)

Pemán J, Cantón E. Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida species* isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [en línea]. 2005, Vol. 24, nº1, p: 23-30.

Pemán J. , Cantón E. , Linares Sicilia MJ. , Roselló E.M. , Borrell N. , Ruiz-Pérez-de-Pipaon MT. , Guinea J. , García J., Porras A , García Tapia A.M , Pérez-Del-Molino L , Suárez A , Alcoba J , García-García Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Bloodstream Fungal Isolates in Pediatric Patients: a Spanish Multicenter Prospective Survey. *J. Clin. Microbiol.* [en línea]. 2011, vol. 49, nº. 12, p.4158-4163. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/49/12/4158.full>

Peñuelas J, Ribas - Carbo M and Giles L (1996). Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. *Journal Chem. Ecol* Vol 22, p 801-805.

Pfaller, M A. and Diekema, D. J. Epidemiology of invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007, vol 20, nº 1, p. 133-163. Disponible en: <http://cmr.asm.org/content/20/1/133.abstract>

Pío J, Díaz S., López M., Uribe M, Willms K, López G, Montes J, Delgado F. Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). 2013. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat Vol 12, nº4, [citado 29-03-2014] p .356 – 364. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85628141003.pdf>

Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997, vol.10, nº 3, p.444-465. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172929/>

Reynel C; Marcelo J. Árboles de los ecosistemas forestales y andinos .Manual de identificación de especies. Serie investigación y sistematización Nº9. Programa Regional – ECOBONA- INTERCOOPERATION. 1era Edición. Lima 2009, p. 106 - 108.

Rodríguez G., Ramón Gerardo, Morales R., Ma. Eufemia, Verde S., Ma. Julia, Oranday C., Azucena, Rivas M., Catalina, Núñez G., Ma. Adriana, González G., Gloria M., Treviño N., Jaime Fco. Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea] 2010, Vol. 41, Núm. 1, enero-marzo, [fecha de consulta: 19 de noviembre de 2013] pp. 55-59

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57912960007> ISSN 1870-0195.

Rogelio J, Treviño R, González J, Garza E, González G. *Candida parapsilosis*, una amenaza desafiante. *Medicina Universitaria* 2012; Vol., 14, n°56, p, 157-165.

Rojas J., García Aura M., López Alvin J. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica Santiago, Chile 2005; Vol. 4, n° 2, p. 31- 32

Ruiz Quiroz, Julio Reynaldo. Actividad Antifungica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales.(Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología).Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post-Grado. Lima – Perú 2013.

Sellés Eugenio. *Farmacía galénica*. Madrid, Editorial Celsa, 1992.p 152- 156.

Silva R., H. Deboni H, Kato M., Bolzani V., Méda C., Young M. & Furlan M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 2002. Vol. 59, n°5, p 521-527.

Sotta N. Plantas aromáticas y medicinales de la región de Arequipa. Edit. Akuaella. Arequipa; 2000.

Tibavizco D., Rodríguez J., Silva E., Cuervo S., Cortés J. Enfoque terapéutico de la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* Biomédica [en línea] 2007, 27 (Junio): [Fecha de consulta: 11 de junio de 2014] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84327216>> ISSN 0120-4157

Tomás Chota Gloria; Huamán Malla Juana .Guía de prácticas de productos naturales. Facultad de química e Ingeniería química. Departamento de Química Orgánica. UNMSM 2009.

Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis* an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; vol 21, n°4, p 606- 625.

Valencia, Cira. Fundamentos de Fitoquímica. Editorial Trillas S.A. España 1995.p 235. ISBN: 9682449405

Villacís, J. (2009). Temas de Medicina Natural: Fitomedicina. Ambato: Ed. Universidad Técnica de Ambato.

Villar R, Alvariño M, Flores R. Inhibition by ajoene of protein tyrosine phosphatase activity in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1997; Vol 1337, n°2, p 233- 240

Voigt Rudolf. *Tratado de tecnología Farmacéutica*. España: Editorial Acribia S.A.1982.

Wen Louise; Haddad Mohamed; Fernández Irma; Espinoza Giovana; Ruiz Candy; Neyra Edgar ; Bustamante Beatriz; Rojas Rosario. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana: aislamiento de 3'- formil - 2',4',6' - trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. Rev. Soc. Quím.

Perú [online]. 2011, vol.77, n°.3 [citado 2013-11-11], p. 199-204. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000300005&lng=es&nrm=iso. ISSN 1810-634X.

W.H.O Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. *World Health Organization*, 2001. Disponible en: [WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2](http://www.who.int/csr/don/2001.2)

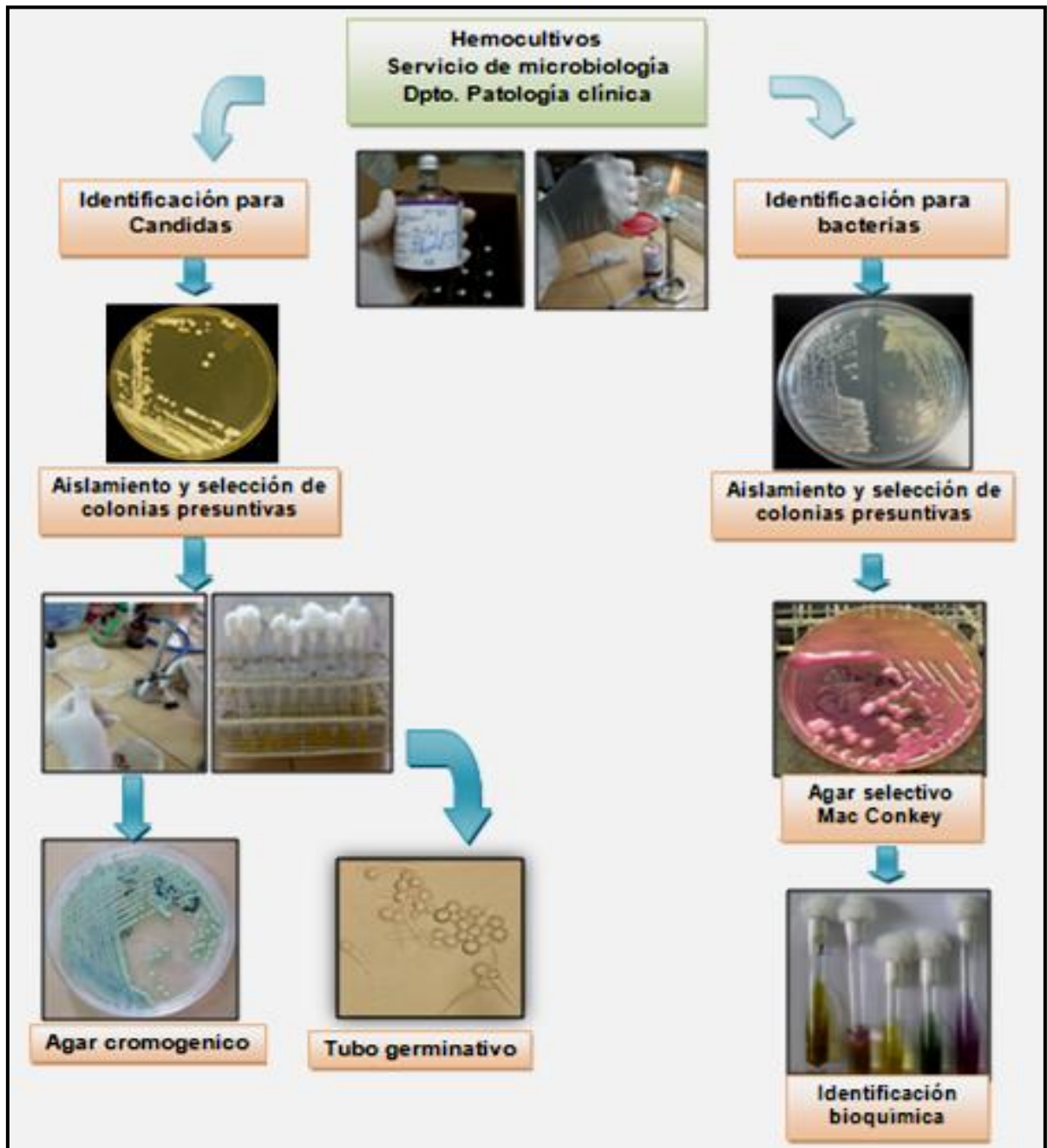
WHO. Informe sobre la salud en el mundo 2002 - Reducir los riesgos y promover una vida sana. Disponible en : http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_es.pdf

Wong, D. Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría. Editorial Acribia S. A. España. 1995. 476 p. ISBN: 8420007757

Yoshida S, Kasuga S, Hayashi N, Ushiroguchi T, Matsuura H, Nakagawa S. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol* 1987, Vol., 53, n°3 [Citado 11-04-2014] p 615-617. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/53/3/615.full.pdf+html>

ANEXOS

Anexo 1. Obtención, reactivación y verificación de las cepas hospitalarias



ANEXO 2

A. Sensibilidad antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*

Patógenos Gram negativos		
Antimicrobianos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
Amikacina	R	R
Amox/A clav	R	R
Ampicilina	R	R
Aztreonam	R	R
Cefazolina	R	R
Cefepima	R	S
cefotaxima	ESBL	S
Cefoxitina	S	S
Ceftazidima	ESBL	S
Ceftriaxona	ESBL	S
Cefuroxima	R	S
Ciprofloxacina	R	R
Ertapenem	S	S
Gentamicina	S	S
Imipenem	S	S
Levofloxacina	R	R
Meropenem	S	S
Tetraciclina	R	R
Ticarciclina	R	R
Tobramicina	R	R
Trimet/Sulfa	R	R

ESBL: Betalactamasa de amplio espectro

B. Sensibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*

Patógenos		
Antimicrobianos	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Amox/A clav	R	R
Amp /Sulfabactam	R	R
Ampicilina	BLAC	R
Ceftriaxona	R	R
Ciprofloxacina	S	S
Clindamicina	S	R
Daptomicina	S	S
Eritromicina	S	R
Gentamicina	S	S
Levofloxacina	R	R
Linezolid	S	S
Oxacilina	S	S
Penicilina	BLAC	BLAC
Rifampicina	S	R
Tetraciclina	R	R
Trimet/Sulfa	R	R
Vancomicina	S	S

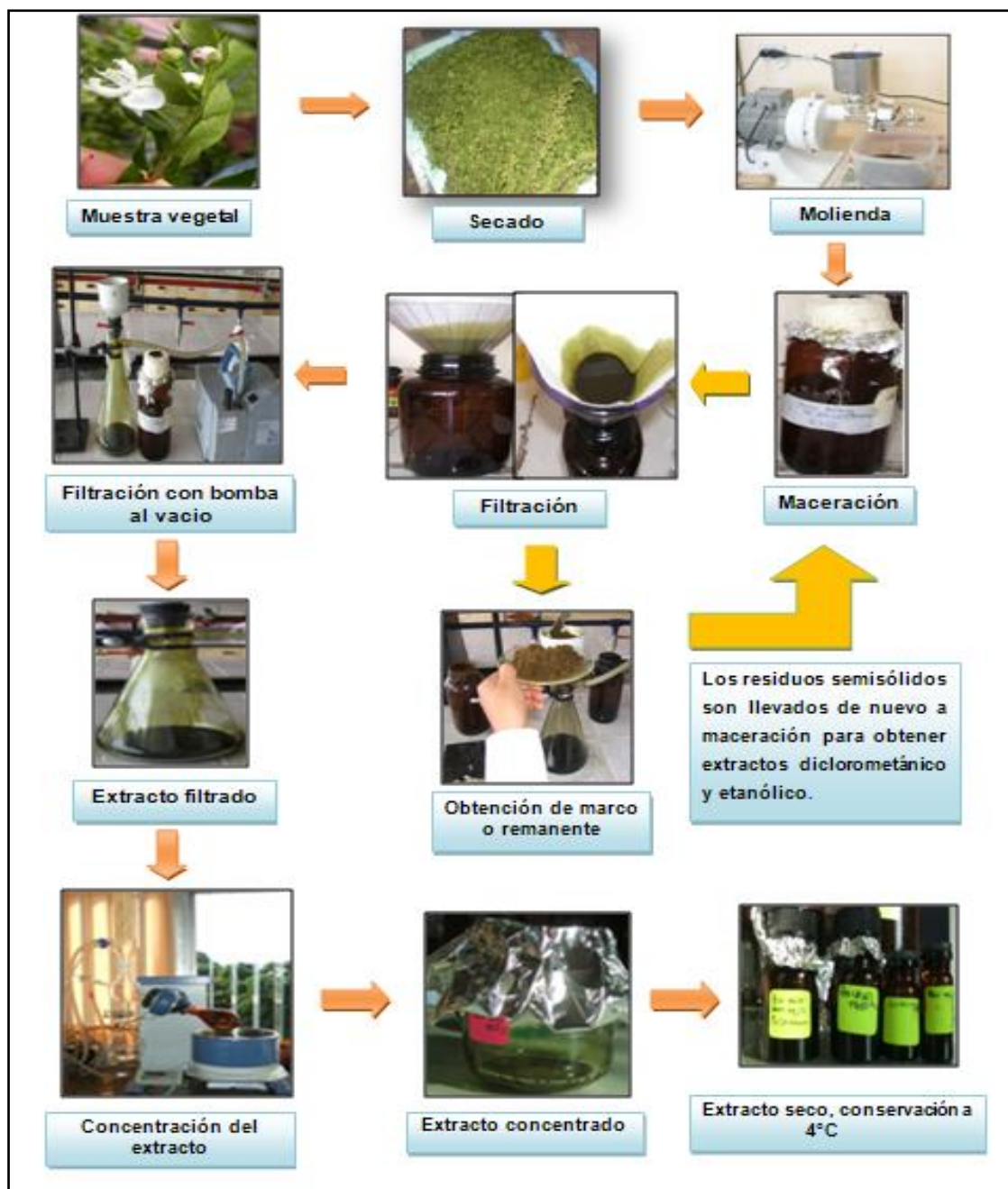
BLAC: Betalactamasa

C. Sensibilidad antifúngica de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*

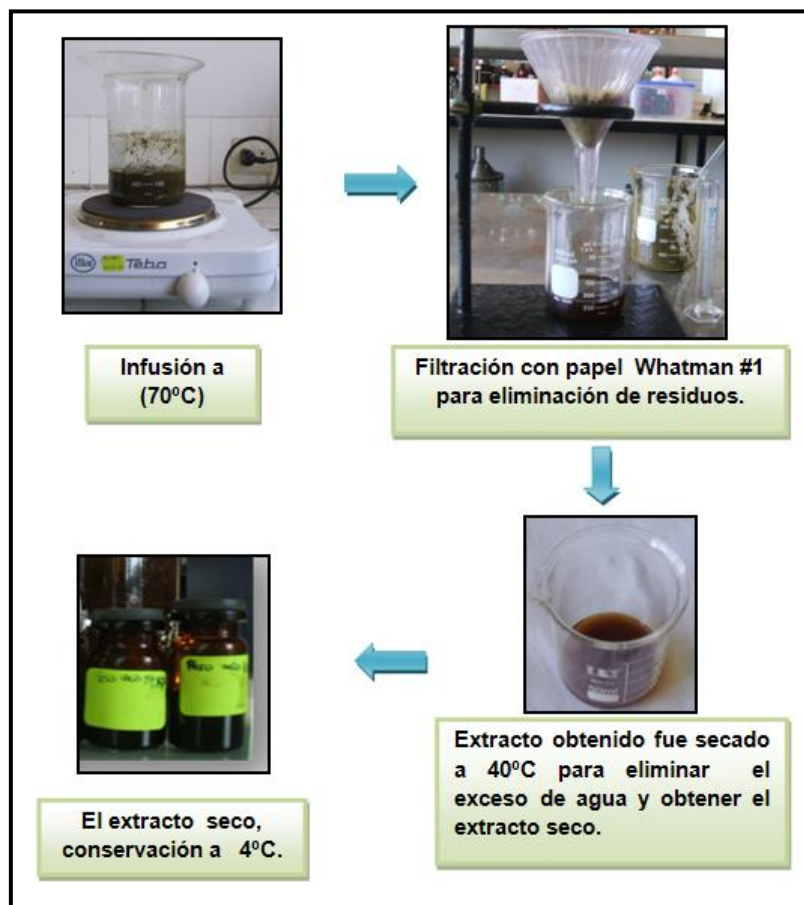
Cepas patógenas de Candidas			
Antifungicos	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilopsis</i>
Flucitosina	R	I	R
Fluconazol	I	I	S
Voriconazol	S	S	S
Anfotericina B	S	S	S

Anexo 3.

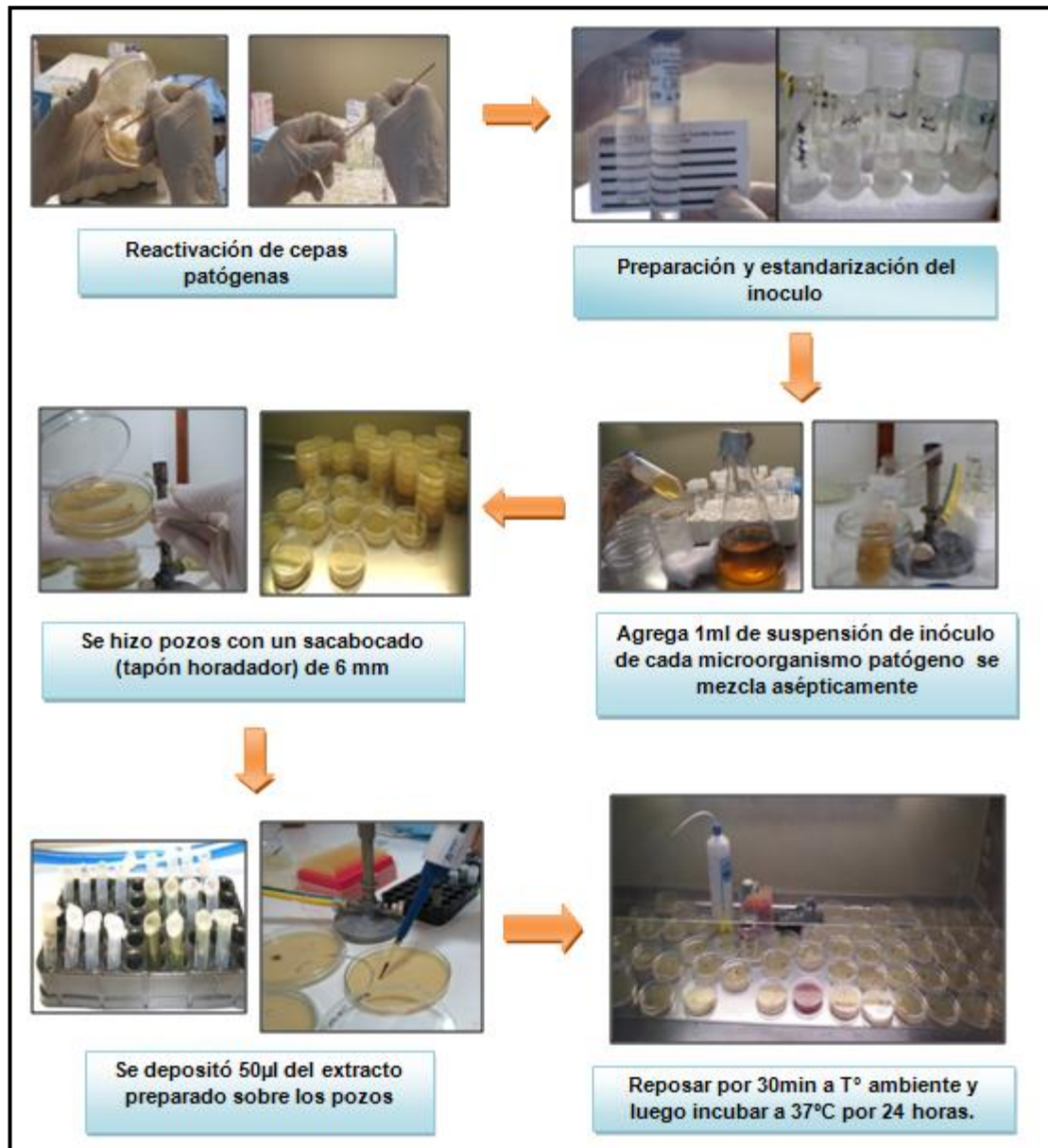
A. Procedimiento para obtener extracto hexánico, diclorometánico y etanólico de *Luma chequen*



B. Procedimiento para obtener extracto acuoso de *Luma chequen*

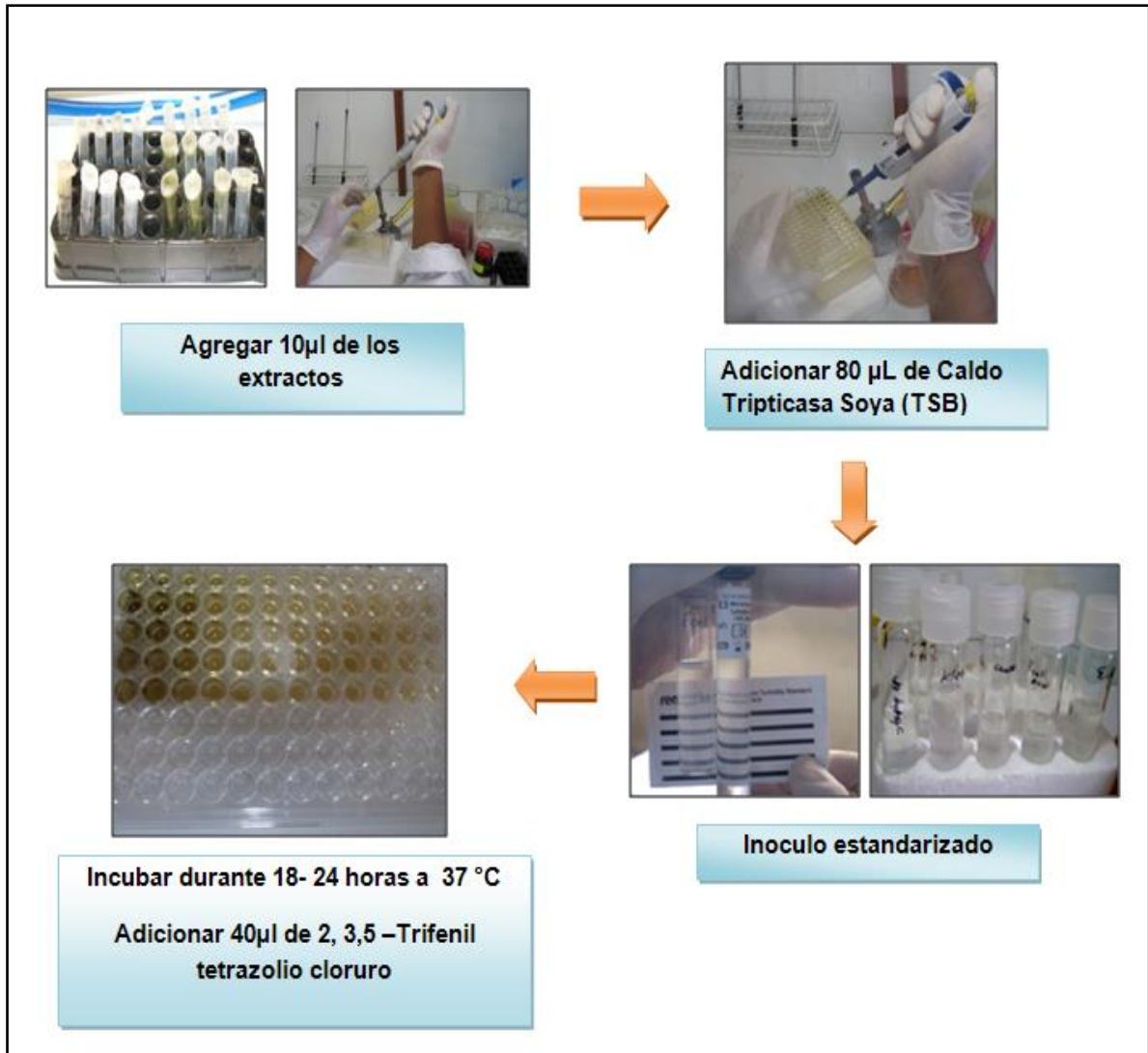


Anexo 4. Determinación de la sensibilidad de cepas patógenas a los extracto de hexano, diclorometano, etanol y agua de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” mediante el Método Modificado de Difusión en Pocillos (MDP)

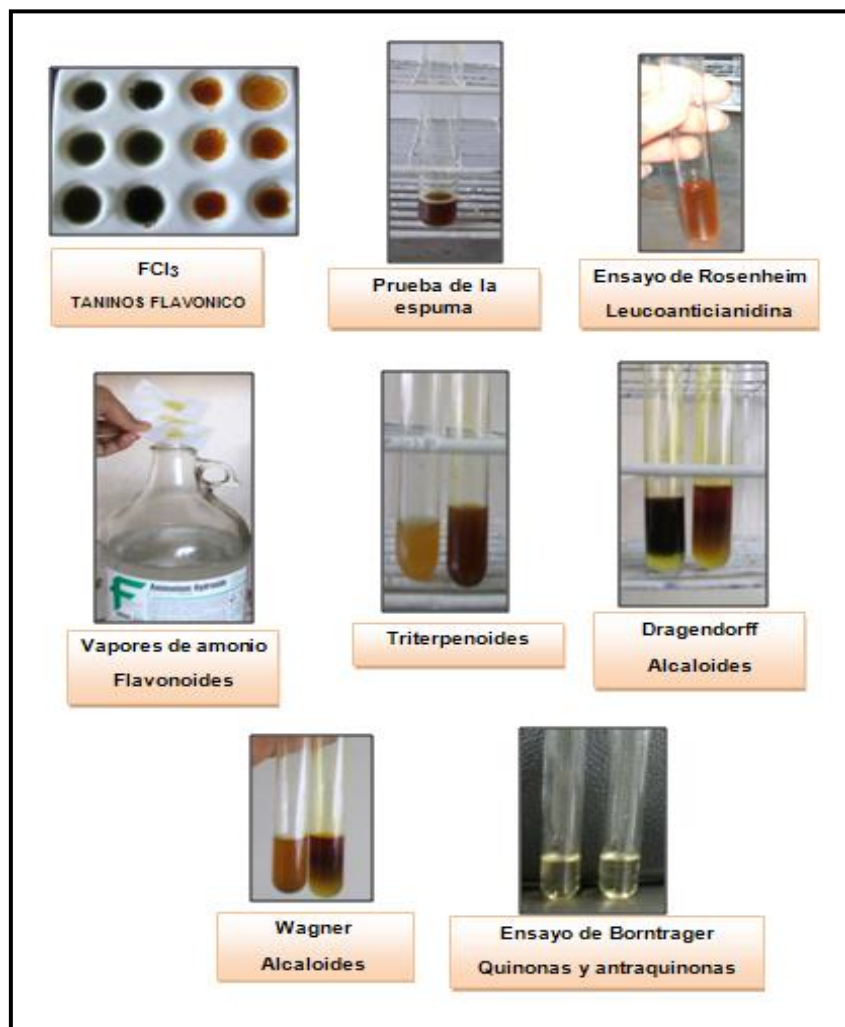


ANEXO 5.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria



Anexo 6. Pruebas Fitoquímicas



Anexo 7: Constancia de identificación *Luma chequen*

Certificado

Se Certifica:

Que la muestra vegetal recibida de la srta. Jane Torres Chati de la E.A.P. MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA, ha sido estudiada y determinada según el sistema de clasificación de Arthur Cronquist 1981, en la forma siguiente:

DIVISIÓN: MAGNOLIO PHYTA

- CLASE: MAGNOLIPSIDA

- SUBCLASE: ROSIDAE

- ORDEN: MYRTALES

- FAMILIA: MYRTACEAE

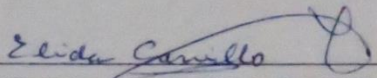
- GÉNERO: *Luma*

- ESPECIE: *Luma chequen* (Molina) A. Gray

NOMBRE VULGAR: "Arrayan"

Se expide el presente certificado a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 29 de Abril de 2014.


Dra. ELIDA CARRILLO FUENTES
C.B.P. 0126

ANEXO 8

Preparación de los reactivos a utilizar en el tamizaje fitoquímico

1. Reactivo de Dragendorff:

Solución *a*: 8 g Bi (NO₃).5H₂O/20 mL HNO₃

Solución *b*: 27.2 g KI/50 mL H₂O

Mezclar, reposar, decantar sobrenadante. Diluir a 100mL.

2. Reactivo de Mayer:

Solución *a*: 1.36g HgCl₂/60 mL H₂O

Solución *b*: 5 g KI/10 mL H₂O

Mezclar y diluir a 100mL.

3. Reactivo de Wagner:

1.27 g de I₂ + 2g KI/5mL H₂O

Diluir a 100mL.

4. Cloruro férrico: Disolver 1,25 g de cloruro férrico en 25 mL de agua y aforar a 50 mL con alcohol metílico.

FUENTE: Lock (1988)

ANEXO 9: Medios de cultivo y reactivos

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Dextrosa Sabouraud CM0041(Oxoid)
- Agar Trypticase Soya (Oxoid)
- Agar Mueller Hinton CM0337(Oxoid)
- **Agar Mac Conkey** (Oxoid)
- Agar sangre (agar base (agar nutritivo) con el agregado de 5 % de sangre ovina)
- BD CHROM agar Candida Medium

REACTIVOS

- Hexano (Merck)
- Diclorometano (Merck)
- Etanol 99.9 % (Merck)
- Agua destilada
- Dimetilsulfóxido (Merck)
- Fluconazol (Sigma-Aldrich, potencia 99,20% y fecha de vencimiento: 30- 9-14)
- 2,3,5- Trifenil Tetrazolium (Sigma-Aldrich)
- Gentamicina sol. inyectable(160mg/2 mL) (Genfar)